

UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA
INSTITUTO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO- IP&D
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA- PPGEB

MARIA EMILIA DE OLIVEIRA BRENHA RIBEIRO

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS, EM FIBROBLASTOS, DA IRRADIAÇÃO COM
LED EM DIFERENTES COMPRIMENTOS DE ONDA ISOLADOS E
COMBINADOS**

São José dos Campos, SP
2020

MARIA EMILIA DE OLIVEIRA BRENHA RIBEIRO

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS, EM FIBROBLASTOS, DA IRRADIAÇÃO COM
LED EM DIFERENTES COMPRIMENTOS DE ONDA ISOLADOS E
COMBINADOS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade do Vale do Paraíba para obtenção do título de Doutora em Engenharia Biomédica.

Orientadora: Prof.^a Dra. Juliana Ferreira Strixino

Co-orientadora: Dra. Juliana Guerra Pinto

São José dos Campos, SP
2020

TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE DIVULGAÇÃO DA OBRA

Ficha catalográfica

Ribeiro, Maria Emilia de Oliveira Brenha
Avaliação dos efeitos, em fibroblastos, da irradiação com LED em diferentes comprimentos de onda isolados e combinados. / Maria Emilia de Oliveira Brenha Ribeiro; orientadora, Juliana Ferreira Strixino; co-orientadora Juliana Guerra Pinto. - São José dos Campos, SP, 2020.

1 CD-ROM, 76 p.

Tese (Doutorado) - Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica.

Inclui referências

1. Engenharia Biomédica. 2. Terapia de baixa intensidade. 3. Terapia de baixa intensidade. 4. Anti-envelhecimento. 5. Fibroblastos. I. Strixino, Juliana Ferreira, orient. II. Pinto, Juliana Guerra, co-orient. III. Universidade do Vale do Paraíba. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica. IV. Título.

Eu, Maria Emilia de Oliveira Brenha Ribeiro, autor(a) da obra acima referenciada:

Autorizo a divulgação total ou parcial da obra impressa, digital ou fixada em outro tipo de mídia, bem como, a sua reprodução total ou parcial, devendo o usuário da reprodução atribuir os créditos ao autor da obra, citando a fonte.

Declaro, para todos os fins e efeitos de direito, que o Trabalho foi elaborado respeitando os princípios da moral e da ética e não violou qualquer direito de propriedade intelectual sob pena de responder civil, criminal, ética e profissionalmente por meus atos.

São José dos Campos, 9 de Fevereiro de 2021.

ME OB Ribeiro

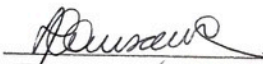
Autor(a) da Obra

MARIA EMILIA DE OLIVEIRA BRENHA RIBEIRO

**“AVALIAÇÃO DOS EFEITOS EM FIBROBLASTOS, DA IRRADIAÇÃO COM LED EM
DIFERENTES COMPRIMENTOS DE ONDA ISOLADOS E COMBINADOS.”**

Tese aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor, do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba – Univap, pela seguinte banca examinadora:

PROF.^ª DR.^ª EMILIA ANGELA LO SCHIAVO ARISAWA



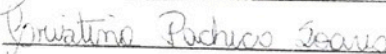
PROF.^ª DR.^ª JULIANA FERREIRA STRIXINO



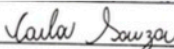
PROF.^ª DR.^ª JULIANA GUERRA PINTO



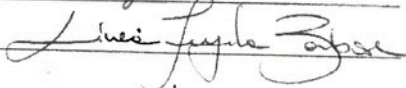
PROF.^ª DR.^ª CRISTINA PACHECO SOARES



PROF.^ª DR.^ª CARLA SOUZA - USP



PROF.^ª DR.^ª LÍVEA FUJITA BARBOSA – Johnson



Prof.^ª Dr.^ª Lúcia Vieira

Diretora do IP&D – Univap

São José dos Campos, 10 de dezembro de 2020.

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra. Juliana Ferreira Strixino, que foi muito além de apenas orientar a parte científica deste trabalho. Obrigada por me acolher no teu grupo e por tantas vezes me encorajar a seguir, mesmo quando tudo parecia propenso ao contrário. Você é exemplo de pesquisadora, mulher e mãe. Que privilégio poder ter contado com sua orientação.

À Prof. Dra. Juliana Guerra Pinto, por todas as contribuições tão importantes ao longo do trabalho. Obrigada pela paciência e constante disponibilidade.

Ao Prof. Alessandro Correa Mendes, Professor Pardal, cuja contribuição foi fundamental para que conseguisse construir o aparato de irradiação objeto deste trabalho.

À Prof. Dra. Mirela, Prof. Dra. Cristina Pacheco Soares, Prof. Dra. Carla Souza, Prof. Dra. Renata de Azevedo Canevari, Dra. Livea Fujita Barbosa e Dra Aline Pereira, membros da banca da qual muito me orgulho, pela disponibilidade e valiosas contribuições a este trabalho.

Aos amigos que fiz no laboratório Fotobios: Luciana, Bruno, Letícia, André, Gabrielle, Rainara, Lara, Beatriz, Juliana, Isabelle e muitos outros que também me ajudaram em todos os momentos ao longo destes anos.

À minha avó, Maria Emilia, e ao meu pai, Mario, que desde sempre, são meu porto seguro, meu refúgio, minhas palavras de apoio e também de chamada à realidade. Amo vocês do fundo do meu coração.

À minha mãe, Lucia, *in memoriam*, que estaria muito orgulhosa deste momento.

Ao meu marido, Rodrigo, exemplo de integridade e companheirismo. Que esteve comigo em todos os momentos, na alegria e na tristeza, ao longo desta trajetória. Que segurou as pontas de dois filhos pequenos em casa para que eu pudesse fazer

experimentos aos finais de semana, escrever madrugada a dentro. Sem você, nada disso seria possível.

Aos meus filhos Lucas e Vítor, minhas inspirações de todo dia. O grande motivo por trás de tudo que faço em busca de ser alguém melhor. O sorriso de vocês foi o que me deu força para chegar até aqui.

Aos meus filhos de quatro patas, Spike e Mila, que sim, merecem estar aqui. Eles, que sempre permaneceram perto de mim nas intermináveis horas ao computador, digitando, pesquisando, digitando...

À minha família tão grande e tão amada, que sempre se faz presente e é o meu maior presente! Meus irmãos: Raphael e Catarina; tios Chico, Helena, Dito, Denize, Patricia, Paulo, Kuka, Fulvio, Claudinho, Márcia, Marinho e Fabiana; sogros: Marcos e Valssinea; cunhados: Rafael e Carmen; e primo-irmão Miguel.

Ao Dr. Henrique Sales Jorge, que primeiramente me inspirou e posteriormente me proporcionou esta aventura. Você é um exemplo de profissional e homem. Obrigada pelos tantos ensinamentos.

À todos os meus colegas da Johnson & Johnson que, em algum momento durante esta jornada estiveram comigo e tanto me apoiaram. Em especial, à Aline, Carol, Edu, Fabricio, Fernanda Pestelli, Fernanda Speretta, Juliano, Karina, Leticia, Paulo e Walter, minha família joseense.

À Johnson & Johnson, pelo subsídio financeiro através do qual este Doutorado tornou-se possível.

AValiação DOS EFEITOS, EM FIBROBLASTOS, DA IRRADIAÇÃO COM LED EM DIFERENTES COMPRIMENTOS DE ONDA ISOLADOS E COMBINADOS.

RESUMO

Diversos trabalhos no campo da fotobiologia têm focado nos efeitos, na pele, da luz visível, compreendida entre 400 – 700 nm. Dentre os comprimentos de onda mais estudados, estão o azul (em torno de 455 nm) e vermelho (em torno de 630 nm), para os quais já foram descritos benefícios tanto no tratamento de patologias, como acne, quanto para efeitos anti-envelhecimento, estimulando a expressão de proteínas relacionadas à manutenção da estrutura da pele. O uso combinado dos diferentes comprimentos de onda, no entanto, ainda não foi explorado, apesar de já existirem equipamentos com esta característica em uso tanto por médicos quanto consumidores. O objetivo deste trabalho foi aprofundar o conhecimento na combinação de três diferentes comprimentos de onda: região de 525 nm (luz verde), 630 nm (luz vermelha) e 455 nm (luz azul). A primeira etapa consistiu na idealização, montagem e testagem da operação de um aparato para irradiação, pois não há disponível comercialmente para estudos *in vitro*. O aparato foi construído e apresentou-se preciso na irradiação dentro dos comprimentos de onda de interesse. Para ele, foi solicitado um Registro de Software, já concedido, e também depositada uma Patente de Invenção. Os efeitos da irradiação foram caracterizados sob três aspectos: 1) citotoxicidade, por meio de ensaios de exclusão por azul de *Trypan* e micronúcleo; 2) formação de radicais livres, pelo marcador H₂DCF-DA e, 3) análise do conteúdo proteico, pelo SDS-PAGE. Três fluências foram testadas: 80 J/cm², 40 J/cm² e 4 J/cm². A fluência 80 J/cm² apresentou mortalidade celular em torno de 11% e foi excluída. A fluência de 40 J/cm² apresentou resultados similares ao controle negativo nos ensaios de Micronúcleo e Formação de Espécies Reativas de Oxigênio, sendo a escolhida para análise do conteúdo proteico. Neste, foram encontradas bandas referentes à colágeno, laminina e elastina, além de metaloproteinases de matriz e fatores de crescimento de fibroblasto (FGF). O colágeno I foi positivamente regulado pelo LED vermelho, mas negativamente pelo LED verde. Para Laminina, não foram encontradas diferenças qualitativas entre os grupos. Demonstrou-se diminuição de MMP-1 nas condições onde havia incidência de luz vermelha corroborando os achados de literatura, além de diminuição na expressão de MMP-7 e MMP-14, resultados ainda não descritos. Para FGF demonstrou-se, pela primeira vez, possível efeito inibitório do LED verde. Já o LED vermelho, por sua vez, apresentou-se similar ao controle, diferentemente do descrito em literatura, muito provavelmente devido à compensação do efeito dos LEDs verde e azul. Concluiu-se que a interação entre os diferentes comprimentos de onda pode levar a interferências nos resultados, como é o caso da expressão de FGF sendo afetada pela irradiação conjunta com outros LEDs. Sugere-se uso de marcadores específicos e técnicas quantitativas para confirmação destes achados.

Palavras-chave: Terapia de baixa intensidade. Terapia com luz visível. Anti-envelhecimento. LED. Fibroblastos. Pele.

EVALUATION OF THE ANTI-AGEING EFFECTS, IN FIBROBLASTS, OF THE IRRADIATION WITH LED USING DIFFERENT WAVELENGTHS, ALONE AND IN COMBINATION

ABSTRACT

Several studies in photobiology field have been focusing on the effects of visible light (400 – 700 nm) on the skin. The most studied wavelengths are blue (around 455 nm) and red (around 630 nm), for whom several benefits are already described for treatment of skin conditions (such as acne) as well as anti-ageing, upregulating the expression of key proteins responsible for the skin structure maintenance. The combined use of different wavelengths is yet not explored, even though there are devices that provide such capability being used by doctors and consumers alike. The main objective of this work was to deepen the knowledge on the combination of three distinct wavelengths: 525 nm (green light), 630 nm (red light) and 455 nm (blue light). The first stage encompassed the ideation, build up and test of an apparatus with this capability, as there is no such commercially available for *in vitro* studies. The equipment complied with all wavelengths with precision. As an additional result, the software developed was granted a register in the National Patents Office and an Invention Patent is filed to cover the hardware. The irradiation effects were characterized by 1) cytotoxicity, by Trypan Blue and Micronucleus assays; 2) reactive oxygen species formation, through the marker H₂DCF-DA and 3) protein content through SDS-PAGE. Three fluencies were studied: 80 J/cm², 40 J/cm² e 4 J/cm² being the highest one excluded right after Trypan Blue assay due to its impact on cell viability, presenting around 11% of cell death. The fluency of 40 J/cm² presented similar results when compared to the control on both Micronucleus and ROS assays, being then chosen to the analysis of protein content. On the protein content assay, it was possible to identify bands of molecular weight corresponding to collagen, laminin, and elastin, besides matrix metalloproteinases and fibroblast growth factor. Collagen 1 was upregulated by red light, whereas downregulated by the green one. Regarding Laminin, no differences were found. Downregulation of MMP-1 was found in conditions where red light was used, reinforcing literature data. Besides that, there was downregulation of MMP-7 and MMP-14, being these results new to the state of the art. Green light downregulated FGF and, red light presented results comparable to the negative control. This finding does not correlate with the literature review) most likely because it's compensating the downregulation influenced by green and blue LED. In conclusion, the interaction between different wavelengths can lead to interferences, as this study showed with the expression of FGF. It's suggested the usage of more specific markers and quantitative techniques to corroborate these results, though.

KEYWORDS: *Low-level light therapy. Visible light therapy. Anti-ageing. LED. Fibroblasts. Skin.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática da estrutura da pele	18
Figura 2: Diferentes fenômenos na interação da luz com o substrato biológico.....	19
Figura 3: Representação esquemática da profundidade de penetração dos diferentes comprimentos de onda da luz visível na pele.....	20
Figura 4: Espectro de absorção dos cromóforos presentes na pele.....	21
Figura 5: Mecanismo geral de ação da luz visível.....	22
Figura 6: Mecanismo de regulação do estresse oxidativo e resposta inflamatória pela ativação da cascata de sinalização SPHK1.....	23
Figura 7: Visão externa do aparato de irradiação celular.....	35
Figura 8: Visão detalhada do interior do aparato de irradiação celular.....	36
Figura 9: Representação esquemática do sistema eletrônico que controla o aparato de irradiação celular.....	37
Figura 10: Gráficos demonstrando a distribuição de intensidade de luz por comprimento de onda dos três canais operando de forma isolada.....	38
Figura 11: Gráficos demonstrando a distribuição de intensidade de luz por comprimento de onda dos três canais operando de forma concomitante.....	39
Figura 12: Microscopia óptica de fibroblastos submetidos a teste de exclusão por azul de Trypan - Irradiação a 80 J/cm ²	43
Figura 13: Microscopia óptica de fibroblastos submetidos a teste de exclusão por azul de Trypan - Irradiação a 4 J/cm ²	44
Figura 14: Microscopia óptica de fibroblastos submetidos a teste de exclusão por azul de Trypan - Irradiação a 40 J/cm ²	45
Figura 15: Análise quantitativa da viabilidade celular pelo teste de exclusão por com Azul de Trypan.....	46
Figura 16: Representação gráfica de todos os resultados de Viabilidade Celular....	48
Figura 17: Microscopia confocal de fibroblastos submetidos a marcação com DAPI para análise da formação de micronúcleo.....	49
Figura 18: Análise de Genotoxicidade por marcação de Micronúcleo.....	50
Figura 19: Análise da fluorescência de diclorodihidrofluoresceína.....	51
Figura 20: Gel de Poliacrilamida a 10% mostrando o conteúdo proteico dos fibroblastos	53
Figura 21: Gráfico apresentando a distância percorrida por cada fração do padrão de massa molecular a depender da distância percorrida no gel.....	54
Figura 22: Recortes do gel SDS-PAGE evidenciando a migração de diferentes pesos moleculares.....	56
Figura 23: Diferentes equipamentos disponíveis no mercado para tratamento de sinais de envelhecimento, acne, dentre outros.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Protocolos de radiação descritos na literatura na região do espectro visível.	27
Tabela 2: Resumo do plano experimental com as diferentes combinações de LED.	31
Tabela 3: Diferentes fluências utilizadas, por ensaio.....	31
Tabela 4: Primeira etapa, irradiação para screening da viabilidade celular através de Azul de Trypan.....	31
Tabela 5: Resultados de irradiância obtidos para a emissão dos LEDs.....	40
Tabela 6: Tempos de irradiação calculados a partir da irradiância de cada LED ou combinação para atingir a fluência desejada.....	41
Tabela 7: Temperatura dentro do equipamento em funcionamento em diferentes tempos.....	42
Tabela 8: Análise de grupamentos por método Tukey para determinação de diferenciação significativa entre as combinações de luz utilizadas.....	47
Tabela 9: Agrupamento das diferentes condições de irradiação das células resultante da análise realizada com teste de Tukey.....	47
Tabela 10: Quantificação do conteúdo proteico extraído por condição irradiada.....	51
Tabela 11: Inferência da massa molecular apresentada pelas diversas bandas por interpolação do padrão.....	54
Tabela 12: Resultado da busca na base de dados UniProt por proteínas com massa molecular de acordo com os dados aproximados determinados por SDS-PAGE.....	56
Tabela 13: Correlação entre as metaloproteinases com peso molecular correspondente ao encontrado no SDS-PAGE e seus respectivos substratos já descritos em literatura.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP – Adenosina trifosfato

DAPI - 4',6'-diamino-2-fenil-indol

DCF - Diclorofluoresceína

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

FGF – Fator de crescimento de fibroblastos

H₂DCF-DA – Dihidrodiclorofluoresceína diacetato

IFN - Intérferon

Ig – Imunoglobulina

IL – Interleucina

Laser – *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*

LED – *Light Emitting Diode*; Diodo emissor de luz

LLLT – *Low level light therapy*; Terapia de luz de baixa intensidade

MMP – *Matrix metalloproteinases*; Metaloproteinases de matriz

NGF – Fator de crescimento neuronal

PBS – Tampão fosfato em solução salina

RIPA – *Radioimmunoprecipitation assay buffer*, Tampão para ensaio de radioimunoprecipitação

EROs – Espécies reativas de oxigênio

SDS - Dodecilsulfato de sódio

PAGE – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

SFB – Soro Fetal Bovino

TEMED – *Tetramethylethylenediamine*, Tetrametiletlenodiamina

TNF – Fator de Necrose Tumoral

UV - Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 JUSTIFICATIVA	15
3 OBJETIVO	16
3.1 Objetivo Geral	16
3.2 Objetivos Específicos	16
4 REVISÃO DE LITERATURA	17
4.1 Estrutura, propriedades e envelhecimento da pele	17
4.2 O uso da Fototerapia de baixa intensidade e seu mecanismo de ação	18
4.3 Efeitos biológicos da irradiação com LED vermelho	23
4.4 Efeitos biológicos da irradiação com LED azul	25
4.5 Efeitos biológicos da irradiação com LED verde	26
4.6 Protocolos de irradiação	26
5 MATERIAL E MÉTODO	30
5.1 Cultura e manutenção de fibroblastos	30
5.2 Irradiação das células com LED (light-emitting diodes)	30
5.3 Avaliação da viabilidade celular pelo Teste de exclusão por Azul de Trypan	31
5.4 Análise de Genotoxicidade por Micronúcleo	32
5.5 Detecção da formação de espécies reativas de oxigênio	33
5.6 Análise do conteúdo proteico dos fibroblastos por eletroforese	33
5.6.1 Extração e quantificação de proteínas	33
5.6.2 Eletroforese SDS-PAGE (Sodium Dodecyl-Sulfate – Polyacrilamide Gel Electrophoresis)	34
6 RESULTADOS	35
6.1 APARATO EMISSOR DE LUZ	35
6.1.1 Construção do aparato emissor de luz	35
6.1.2 Caracterização do aparato de irradiação	37
6.1.2.1 Determinação do comprimento de onda emitido por cada um dos LEDs e suas combinações	37
6.1.2.2 Determinação da densidade de potência óptica (irradiância) emitida por cada um dos LEDs e suas combinações	39
6.1.2.3 Determinação dos tempos de irradiação para cada uma das fluências a ser estudada	40
6.1.2.4 Verificação da temperatura de operação	41
6.2 ESTUDO DOS EFEITOS DA IRRADIAÇÃO EM FIBROBLASTOS	42

6.2.1 Avaliação da viabilidade celular pelo Teste de exclusão por Azul de Trypan	42
6.2.2 Análise de Genotoxicidade por Micronúcleo	48
6.2.3 Detecção da formação de espécies reativas de oxigênio	50
6.2.4 Análise do conteúdo proteico dos fibroblastos por eletroforese	51
7 DISCUSSÃO	57
8 CONCLUSÕES	65
9 CONFLITOS DE INTERESSE	66
REFERÊNCIAS.....	67
ANEXO 1 – CERTIFICADO DE REGISTRO DE SOFTWARE NO INPI	72
ANEXO 2 - PEDIDO DE PATENTE DE INVENÇÃO – APARATO DE IRRADIAÇÃO LUMINOSA	73

1 INTRODUÇÃO

Estudos em fotodermatologia têm focado há anos apenas na radiação UV, devido a esta conter energia suficiente para desencadear efeitos biológicos na pele. No entanto, estudos mais recentes vêm investigando mais profundamente os efeitos de luz visível – compreendida entre 400 – 700 nm (MAHMOUD, 2008; CHUNG *et al.*, 2012; MAMALIS; SIEGEL; JAGDEO, 2016).

O primeiro trabalho descrevendo efeitos biológicos do uso de luz visível foi publicado em 1967, em Budapeste, Hungria. O objetivo inicial do trabalho era verificar o potencial carcinogênico da mesma, irradiando o dorso raspado de camundongos com laser de rubi emitindo em 694 nm com baixa intensidade. O grupo tratado não desenvolveu câncer, mas apresentou crescimento capilar mais acelerado que o do grupo não tratado (HAMBLIN; DEMIDOVA, 2006).

O campo que se desenvolveu a partir daí, conhecido genericamente como Terapia de Luz de Baixa Intensidade (em inglês, *Low Level Light Therapy*), compreende estudos com laser (fonte de luz coerente) e LEDs (*light emitting diodes*) de baixa intensidade. Em relação ao laser, o LED demonstra uma série de benefícios, como menor custo e menor intensidade sendo, portanto, potencialmente menos danoso ao tecido (ABLON, 2018). Os primeiros trabalhos, abordados nas revisões de história da fotobiologia feitas por Daniel & Hills (1991) e Ackroyd *et al.* (2001), a exemplo do descrito acima, focaram em verificar a existência de efeitos terapêuticos obtidos com a incidência de luz. Uma série de diferentes artigos demonstra efeitos identificados e descritos, por exemplo, para rejuvenescimento da pele, tratamento de acne, vitiligo, lesões causadas pelo Herpes simplex vírus, cicatrização, tratamento de queimaduras e psoríase (AVCI *et al.*, 2003; BAROLET *et al.*, 2009; KERPPERS *et al.*, 2015; KIM *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2016; ALBA *et al.*, 2017; ABLON, 2018). No entanto, até o momento, a maioria destes trabalhos encontra-se focado em apenas duas regiões do espectro, em torno de 455 nm e 625 nm, correspondente a luz azul e vermelha, respectivamente.

Além dos efeitos biológicos, também já foram descritos em literatura, diferentes mecanismos de ação por meio dos quais estes comprimentos de onda interagem com as estruturas celulares (KARU, 1999; HAMBLIN; DEMIDOVA, 2006), utilizando cromóforos como carreadores de energia.

Justamente por atuarem em moléculas reativas que estão inseridas em cadeias metabólicas, não há apenas efeitos benéficos, mas também já foram descritos efeitos deletérios. Os autores Kielbasa, Epe (2000) e Haywood (2006), demonstraram que a natureza do efeito estaria ligada ao comprimento de onda utilizado e à quantidade de irradiância recebida. Por exemplo, os estudos relatados por Kielbassa, Roza e Epe (1997), descrevem o aumento da endonuclease de reparo Fpg (Formamidopirimidina DNA glicosilase) em comprimentos de onda entre 330 nm e 490 nm, com pico em 430 nm. Aumentos na quantidade desta enzima se correlacionam à excitação direta do DNA, que pode levar à oxidação do mesmo. A formação de radicais livres sob efeito de comprimentos de onda maiores que 400 nm também está descrita nos achados de Haywood, 2006. Sendo assim, para correta interpretação da eficácia apresentada pela presente terapia, se faz necessário investigar seus efeitos citotóxicos.

Com o vasto e promissor campo no uso dos LEDs vermelho e azul, pouco foi investigado com relação a outros comprimentos de onda, como ao redor de 525 nm (verde) sendo grande parte da literatura publicada nos últimos dez anos. No entanto, os poucos artigos existentes demonstram resultados promissores. Entre eles, podemos citar o aumento na expressão de proteínas estruturais da pele, como colágeno e também a diminuição de citocinas pró-inflamatórias, como interferon γ (IFN- γ), após tratamento com LED à 525 nm (WEISS *et al.*, 2005; KIM *et al.*, 2016; CHO *et al.*, 2016).

2 JUSTIFICATIVA

Há décadas, a chamada Terapia de Baixa Intensidade é utilizada de forma pontual e esporádica no tratamento de diversas complicações dermatológicas, como acne, vitiligo, tratamento de queimadura e psoríase.

Mais recentemente, com a maior preocupação da população com o envelhecimento e a preferência por alternativas não medicamentosas, a LLLT passou a ser usada de forma preventiva. Esta pode ser usada como forte aliada em tratamentos estéticos para anti-envelhecimento, principalmente devido à sua comprovada eficácia na produção de colágeno e inibição de expressão de metaloproteinases de matriz, na região do vermelho do espectro eletromagnético (entre 600 e 700 nm).

Além disso, resultados positivos no controle da proliferação e morte da bactéria *Propionibacterium acnes*, após irradiação em torno de 415 - 430 nm (luz azul) também impulsionaram o uso do mesmo em tratamentos de acne.

A partir desses achados, e levando-se em consideração o potencial de crescimento do mercado de beleza (que cresceu 6,0% em 2019 e atualmente está avaliado em 538 bilhões de dólares, segundo o Euromonitor (2020) foi lançada uma série de produtos comerciais, com emissão em diferentes comprimentos de onda para diferentes aplicações. A grande maioria, focado na região entre 415 nm, 630 nm e 830 nm individualmente ou em combinação. À exemplo, pode-se citar os equipamentos comerciais Omnilux, da empresa GlobalMed Technologies, utilizados para finalidade estética (OMNILUX, 2020).

Apesar de todo este conhecimento construído, a grande maioria dos trabalhos descreve os efeitos de determinado comprimento de onda irradiado de maneira isolada e poucos demonstram efeitos combinados, dos diferentes LEDs sendo utilizados de maneira concomitante. Além disso, há também oportunidade para compreender melhor os efeitos de outras partes do espectro eletromagnético como a região compreendida entre 500 e 550 nm, correspondente à luz verde.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

Elaborar um único equipamento LED com três comprimentos de onda (455 nm, 520 nm e 630 nm) e avaliar os efeitos decorrentes de sua aplicação em fibroblastos.

3.2 Objetivos Específicos

I - Elaboração de um equipamento à base de LEDs, capaz de emitir, tanto de forma independente quanto conjunta, luz nos comprimentos de onda em torno de 455 nm , 520 nm e 630 nm;

II - Determinar a viabilidade celular e os possíveis danos ao DNA para diferentes fluências/ combinações de luz irradiada(s), utilizando os ensaios de exclusão por azul de Trypan e Micronúcleo;

III- Determinar os efeitos da irradiação em diferentes fluências/ combinações de luz irradiada(s), na geração de espécies reativas de oxigênio, com o marcador diacetato 2' – 7' diclorofluoresceína;

IV - Dentre as fluências não citotóxicas, detectar os efeitos no conteúdo proteico dos fibroblastos, irradiados com a luz verde e suas combinações, por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

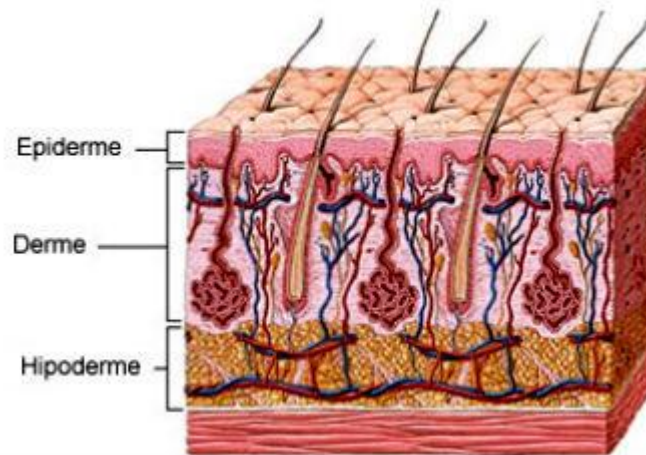
4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Estrutura, propriedades e envelhecimento da pele

A pele, órgão que pode chegar a atingir 25 mil centímetros quadrados em um adulto, constitui uma importante defesa do corpo humano, pois é barreira a uma série de patógenos e fatores externos que podem ser prejudiciais ao nosso organismo, como vírus, bactérias e a radiação UV. Além disso, exerce outras importantes funções como controle de temperatura e absorção e secreção de líquidos, além de funções estéticas e sensoriais, como aparência, toque e maciez (HARRIS, 2009).

A pele é composta por três camadas funcionalmente distintas (Figura 1): epiderme, derme e hipoderme. A epiderme tem por principal função atuar como barreira protetora contra o ambiente externo, evitando a entrada de substâncias nocivas ao organismo e, ao mesmo tempo, retendo o conteúdo interno, como água, eletrólitos e nutrientes. Ela é composta principalmente por queratinócitos que se diferenciam conforme se direcionam da camada mais interna (camada basal) para a camada mais externa (estrato córneo) da mesma. Além disso, nela também se situam melanócitos (responsáveis pela produção de melanina); células de *Langerhans* (células do sistema imune); e as células de *Merkel* (células receptoras do tato). A epiderme também é transpassada pelas estruturas dos anexos da derme: folículos pilossebáceos e glândulas sudoríparas (HARRIS, 2009; GILABERTE *et al.*, 2016). Abaixo da epiderme, encontra-se a derme que é um tecido elástico e fibroso, responsável pela flexibilidade e resistência da pele. Ela é constituída majoritariamente por fibroblastos, responsáveis pela produção de colágeno e outras proteínas constituintes da matriz extracelular, como elastina. Além destas, a derme também contém células do sistema imune, como mastócitos e macrófagos e é atravessada por vasos sanguíneos e nervos. O colágeno é a principal proteína constituinte da derme, que é um tecido conjuntivo propriamente dito, exercendo fundamental função estrutural nestes tecidos. Abaixo da derme, encontra-se a hipoderme, basicamente constituída de tecido adiposo, sendo responsável pela regulação da temperatura e funcionando também como um depósito funcional.

Figura 1: Representação esquemática da estrutura da pele, dividida em suas três camadas: epiderme, derme e hipoderme.



Fonte: Magalhães, 2020.

Justamente por sua função de atuar na relação do indivíduo com o meio ambiente, a pele está suscetível à ação de fatores tanto intrínsecos (como hereditariedade, etnia) quanto extrínsecos (como temperatura, poluição, exposição à UV). Em ambos os mecanismos é descrita a formação e atuação de radicais livres (EROs), moléculas extremamente reativas que podem participar de diversas reações químicas cuja interação pode comprometer a função celular (JENKINS, 2002). Os principais alvos das ERO incluem proteínas estruturais como colágeno e elastina; lipídeos da membrana celular e estrato córneo; e até mesmo ácidos nucleicos, impactando a decodificação da informação genética e sua subsequente passagem às próximas gerações de células. Assim sendo, os principais efeitos relacionados ao envelhecimento referem-se à diminuição na estrutura e elasticidade da pele (flacidez) e perda na capacidade de retenção de água, levando à formação de rugas e perda da maciez (DIRIDLOU *et al.*, 2001).

4.2 O uso da Fototerapia de baixa intensidade e seu mecanismo de ação.

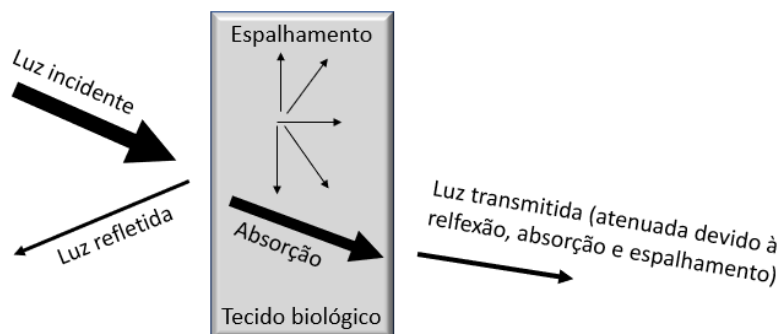
A radiação pode ser classificada entre ionizante e não ionizante, dependendo da forma como interage com o substrato. A radiação ionizante é aquela que contém energia suficiente para remover elétrons da órbita de um determinado átomo, quando em interação com ele, tornando-o ionizado. Raios X, raios gama e Ultravioleta (UV) são classificados como ionizantes, por exemplo. Já a radiação Visível é classificada

como não-ionizante por não ser capaz de promover o fenômeno acima descrito (WORLD..., 2020).

A literatura estabelece a relação causal entre exposição à radiação UV e favorecimento de aparecimento de câncer do tipo melanoma, principalmente via danos causados pela ionização do DNA na forma de fotoprodutos, como dímeros de ciclobutano pirimidina (CPDs) e 6-4 fotoprodutos (6-4 PPs) (SAMPLE; HE, 2018). Desta forma, a fim de evitar tais efeitos deletérios, torna-se muito mais interessante o uso de radiações não-ionizantes, como as presentes dentro do espectro de luz visível.

De maneira geral, quando um feixe de luz entra em contato com determinado tecido, ocorrem diferentes tipos de interação, incluindo reflexão, refração, absorção e espalhamento. Em conjunto, o espalhamento e a absorção são responsáveis pelo decaimento dos fótons conforme a luz penetra o tecido (KEISER, 2016) conforme demonstrado no esquema abaixo (Figura 2).

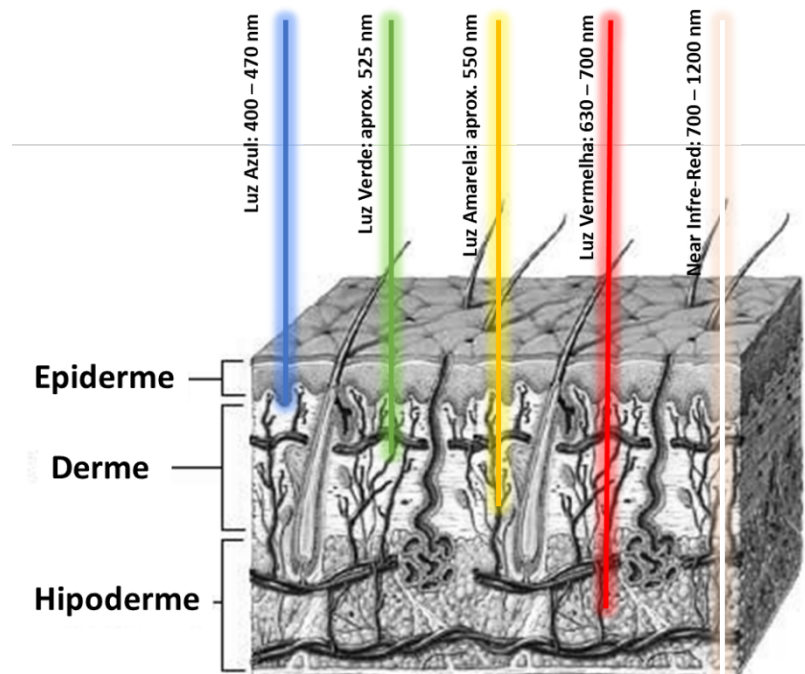
Figura 2: Diferentes fenômenos na interação da luz com o substrato biológico.



Fonte: Adaptado de Keiser, 2016

O mecanismo de ação da fototerapia ainda não está completamente elucidado para todos os comprimentos de onda, uma vez que estes apresentam diferenças na capacidade de penetração e na quantidade de energia e consequente interação com as estruturas da pele (Figura 2) (SORBELLINI; RUCCO; RINALDI, 2018). Alguns estudos na literatura têm discutido o mecanismo de ação genérico, como KARU (1999) e HAMBLIN e Hamblin (2006) (Figura 3) e outros estudos, já mais específicos para determinados comprimentos de onda (DIFFEY; FARR, 2007; MAHMOUD, 2008; SUN *et al.*, 2018).

Figura 3: Representação esquemática da profundidade de penetração dos diferentes comprimentos de onda da luz visível na pele

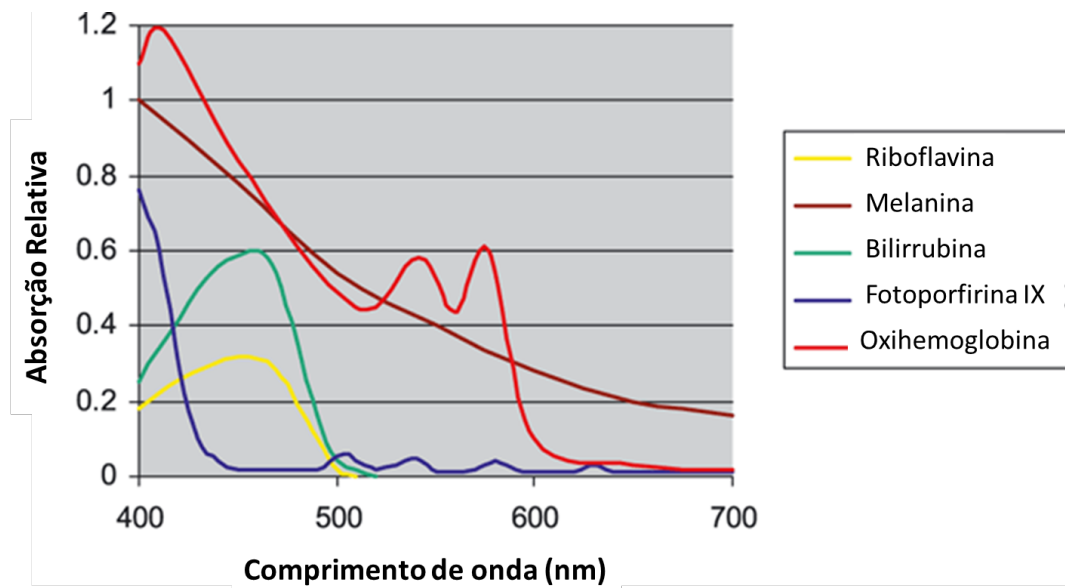


Fonte: Adaptado de Sorbellini, Rucco e Rinaldi, 2018

Uma vez em contato com a pele, os fótons são primeiramente absorvidos, dando início a mudanças químicas nas células. Após a absorção, a energia dos fótons é transferida para um cromóforo para que se desencadeie o seu efeito biológico. Desta forma, a profundidade na qual um determinado comprimento de onda apresenta seu efeito depende da posição e da banda de absorção dos diferentes cromóforos já descritos na pele (DIFFEY; FARR, 2007). Alguns cromóforos absorvem apenas na região do UV, enquanto outros absorvem também no espectro visível. Por exemplo, β -caroteno apresenta pico de absorção em 455 e 490 nm, mas também absorve no UV; protoporfirina IX absorve fortemente em UVA, com pico de absorção em 405 nm, mas também tem banda na região dos 630 nm. Outros cromóforos endógenos que também absorvem luz visível incluem melanina, riboflavina, hemoglobina e bilirrubina, conforme Figura 4 (MAHMOUD, 2008). Após absorverem a luz em determinado comprimento de onda que está sendo irradiado, o cromóforo assume um estado excitado e, por fazer parte de estruturas capazes de regular vias metabólicas, seu estado redox pode levar a efeitos biológicos mensuráveis (KARU, 1999; SORBELLINI;

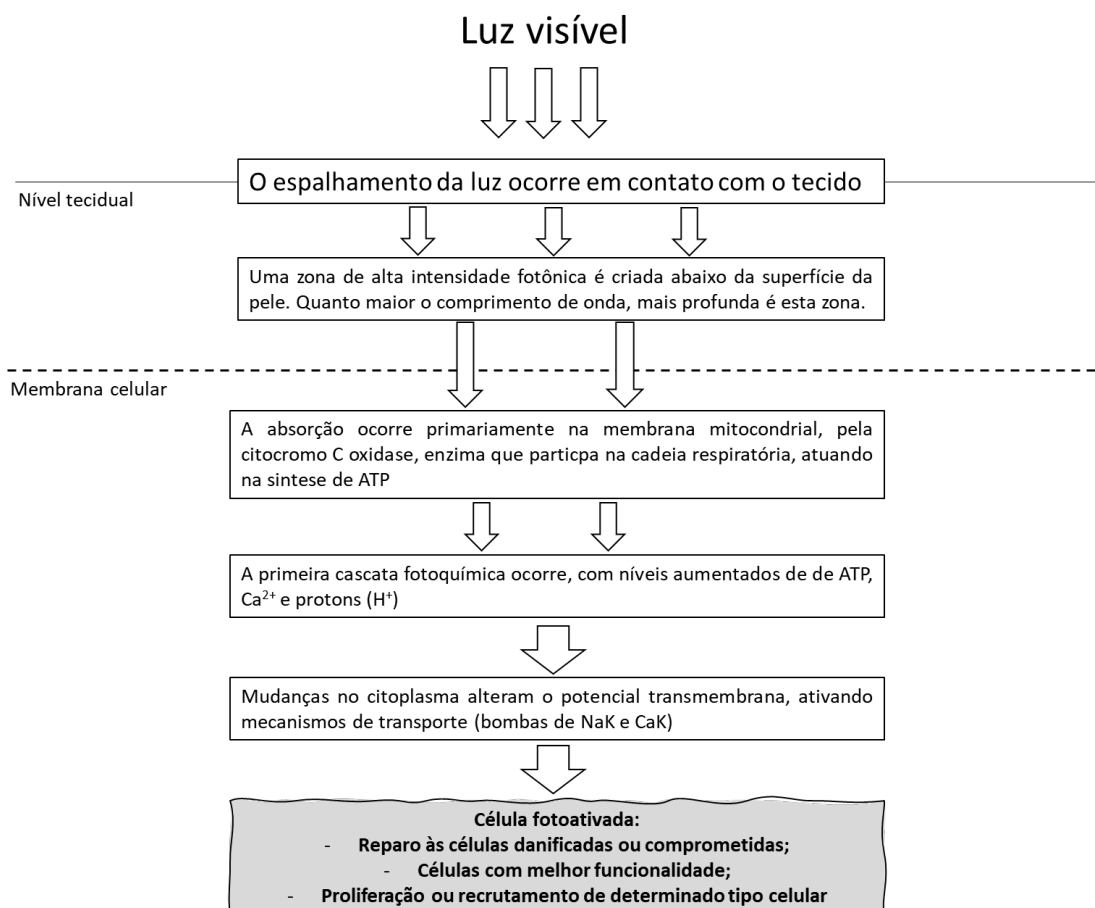
RUCCO; RINALDI, 2018), como estimulação e proliferação celular, conforme os exemplos descritos nesta introdução. Um exemplo de mecanismo genérico de ação está representado na Figura 5.

Figura 4: Espectro de absorção dos cromóforos presentes na pele.



Fonte: Adaptado de Mahmoud et al., 2008

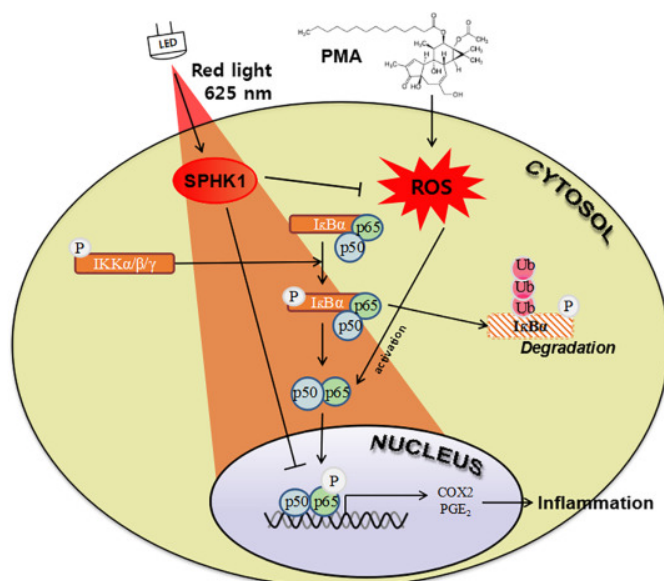
Figura 5: Mecanismo geral de ação da luz visível



Fonte: Adaptado de Kim & Calderhead, 2011

Para alguns comprimentos de onda, já está descrito de forma mais aprofundada o mecanismo de ação. Sun *et al* (2018) induziu o estresse oxidativo em queratinócitos com o uso de PMA (acetato miristato de forbol), conhecido por ser um potente indutor de tumor. Seus efeitos na formação de espécies reativas de oxigênio foram neutralizados com uso de LED 625 nm a 4,5 mW/cm² por 60 min. Este trabalho demonstrou que, para este evento específico, o LED de 625 nm regulou o estresse oxidativo bem como a resposta inflamatória pela ativação da cascata de sinalização SPHK1, conforme esquematizado na figura 6 (SUN *et al*, 2018). A luz vermelha estimula a produção de esfingosina quinase 1 (SPHK1), que modula a inflamação tanto por atuação direta inibindo a transcrição de fatores como prostaglandinas, quanto indireta, diminuindo a formação de espécies reativas de oxigênio.

Figura 6: Mecanismo de regulação do estresse oxidativo e resposta inflamatória pela ativação da cascata de sinalização SPHK1.



Fonte: Adaptado de Sun et al., 2018

4.3 Efeitos biológicos da irradiação com LED vermelho

Diversos efeitos biológicos relacionados ao uso do LED em comprimentos de onda na faixa do vermelho estão descritos como adjuvantes do reparo tecidual. Os mecanismos propostos para a melhora da função da barreira cutânea incluem produção de colágeno, fatores de crescimento, indutores de transcrição de citocinas pró-inflamatórias ou até mesmo pela regulação da produção de componentes lipídicos, como detalhado e referenciado abaixo.

Um estudo realizado com cultura de fibroblastos irradiada em 630 nm com fluência de 2,5 J/cm² demonstrou aumento da expressão de Colágeno tipos I e II com concomitante decréscimo na expressão de metaloproteinases de matriz (MMP) 1 e 2 (KIM *et al.*, 2016). Outros trabalhos com comprimentos de onda entre 627 e 660 nm descrevem efeitos interessantes na pele, como aumento da síntese de colágeno I (KERPERS *et al.*, 2014) e III com concomitante decréscimo da síntese de metaloproteínas (MMPs) (BAROLET *et al.*, 2009; KIM *et al.*, 2015; KIM *et al.*, 2016, MOREIRA *et al.*, 2020).

O colágeno é a proteína mais abundante do tecido conjuntivo contribuindo para a firmeza da pele, além de atuar como fonte de tração em vários outros tecidos. O primeiro sinal visível de envelhecimento da pele são as rugas, basicamente formadas

devido à diminuição na produção de colágeno e aumento na produção e atividade das MMPs (KIM *et al.*, 2015). O mecanismo de ação, neste caso, é a direta absorção da luz pela mitocôndria dos fibroblastos, levando ao aumento da atividade celular, com maior produção de ATP, e conseqüentemente maior produção de colágeno.

Observa-se também a contribuição do LED para aumento de produção de citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento (ESMAEELINEJAD; BAYAT, 2013; KIM *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2016). Mais especificamente, alguns estudos demonstraram aumento na expressão de CD31, Ki67, COX-2, PGE₂ que são moléculas importantes para a indução da transcrição de diversas citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 α , IL-6 e TNF- α , (KIM *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2016; SUN *et al.*, 2018). As citocinas pró-inflamatórias auxiliam no controle do processo infeccioso e preparam o tecido para a recuperação, pelo aumento da capacidade fagocítica, estimulação da migração de queratinócitos nas regiões limítrofes da lesão, quimiotaxia e proliferação de fibroblastos, bem como regulando a liberação de outras citocinas e fatores de crescimento.

Estes dados combinados demonstram o potencial do uso comercial de LED para, por exemplo, uso em tratamentos de rejuvenescimento facial. Outros estudos demonstram também efeitos de comprimentos de onda ao redor de 630 nm tendo efeito em aumento de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e TNF- α , além de fatores de crescimento como NGF e bFGF, e interleucinas envolvidas em proliferação e migração celular, como IL-2 e IL-8 (BAROLET *et al.*, 2009; AVCI *et al.*, 2013; KIM *et al.*, 2016).

Dois estudos de Lanzafame e colaboradores, de 2013 e 2014, utilizaram LED de 655 nm para tratamento de alopecia tanto em homens quanto em mulheres. Os pacientes recebiam fluências diárias de 67,3 J/cm² por 60 dias utilizando um aparato similar a um capacete contendo 21 lasers e 30 LEDs. Comparados a um grupo controle, onde os pacientes recebiam irradiação apenas proveniente de luz incandescente, notou-se melhora significativa (35% e 37% respectivamente) no número de folículos pilosos pós-tratamento.

4.4 Efeitos biológicos da irradiação com LED azul

A literatura sobre LED azul é mais escassa que a apresentada para o LED vermelho, mas já foi descrita sua ação para melhora de quadros de acne de forma isolada ou em combinação com LED vermelho (LEE; YOU; PARK, 2007). Um estudo de Jung *et al.* (2015) mostrou também potencial de regulação de produção de sebo (reduzindo a proliferação de sebócitos) após utilização de luz azul.

Estudos clínicos utilizando LED de 415 nm em diferentes fluências, demonstraram melhora visível em caso de *acne vulgaris* (KIM; CALDERHEAD, 2011; ALBA *et al.*, 2017; ABLON, 2018). Morton *et al.* (2005), demonstraram resultados positivos na diminuição de lesões acneicas utilizando apenas LED azul (409 – 419 nm) em pacientes que apresentavam acne suave a moderada. Neste estudo, os pacientes receberam fluência de 48 J/cm² duas vezes por semana durante quatro semanas e foram avaliados 1, 4 e 8 semanas após o tratamento. A partir da primeira semana após o tratamento foi possível verificar redução (média de 25%), chegando a 60% na oitava semana após o término do tratamento. Resultados similares foram descritos por outros autores, no uso do LED sozinho ou em conjunção com ativos como ácido glicólico e ácido salicílico (TREMBLAY *et al.*, 2006; WHEELAND; DHARWAN, 2011). O mecanismo de ação proposto para este efeito biológico é uma forte ativação de porfirinas endógenas na bactéria *P. acnes*, que resulta na formação de radicais livres, com consequente destruição da membrana celular (ASHKENAZI *et al.*, 2003).

Denda e Fuziwara (2008) utilizaram LED de 430 nm e 670 nm em camundongos, irradiando 20 W por 1 hora e demonstraram que, enquanto a luz vermelha favorece a recuperação da epiderme e derme, a luz azul a retarda, diminuindo a taxa de proliferação de fibroblastos, bem como a velocidade de migração dos mesmos. Além da análise celular, a integridade da barreira cutânea foi indiretamente medida através da perda transepidermal de água (TEWL). Corroborando este dado, Mamalis, Garcha e Jagdeo (2015) também descreveram os efeitos da luz azul no retardo da proliferação e migração de fibroblastos. Estes dados apontam uma possível aplicação no tratamento de queloides e outras doenças de pele que envolvem a formação de processos fibrosos.

A luz azul também se mostrou eficaz no tratamento de psoríase, uma vez que pacientes com esta condição expressam protoporfirina IX. Em estudos *in vivo*, pacientes foram submetidos à irradiação com LED azul (420 nm, 60 J/cm², 50 mW/cm²; 20 min) e mostraram melhora significativa tanto na descamação quanto no eritema (KLEINPENNING *et al.*, 2012).

4.5 Efeitos biológicos da irradiação com LED verde

A maioria dos estudos foca no LED vermelho e alguns outros no LED azul. Para o LEDs verde, compreendido entre 500 nm e 550 nm (OPEL *et al.*, 2015), e seus efeitos na pele, não é muito descrito na literatura. A partir dos anos 2000, alguns grupos iniciaram esta investigação demonstrando resultados promissores. Efeitos benéficos do uso de LED verde (525 nm) foram descritos para o tratamento de dermatite atópica *in vivo*, em modelo murino, com fluência de 40 J/cm² dividida em quatro sessões de 10 J/cm² cada - com densidade de potência de 3,85 mW/cm² (CHO *et al.*, 2016). Neste estudo, verificou-se que o LED verde apresentou efeitos imunomodulatórios, demonstrados pelo decréscimo da expressão de IL-4 e IFN- γ , corroborado pela diminuição nos níveis séricos de IgE. Também já foram descritos efeitos positivos para seu uso em cicatrização de queimaduras (CATÃO *et al.*, 2016; SIMOES *et al.*, 2020). O estudo de Simões *et al.* (2020), utilizou LED 520 nm em fluência de 60 J/cm² por quatro sessões, em modelo murino, e reportou melhora significativa na aparência e índice de retração das feridas. O mesmo estudo também demonstrou a capacidade do LED verde em promover a angiogênese no tecido sendo reparado.

4.6 Protocolos de irradiação

Quanto aos protocolos utilizados, conforme variedade demonstrada na tabela 1 abaixo, ainda não há uma harmonização em relação aos mesmos. Parâmetros como densidade de potência, fluência, distância entre a fonte de luz e o objeto de estudo e até mesmo a forma de irradiação ainda precisam de mais estudos para cada comprimento de onda.

Tabela 1: Protocolos de radiação descritos na literatura na região do espectro visível.

Autores e Ano	Tipo	λ (nm)	Densidade de potência (mW/cm ²)	Fluência (J/cm ²)	D (cm)	MI	Resultados
Morton et al., 2005	<i>In vivo</i>	409 - 419	40	48	NA	Duas vezes por semana por quatro semanas	↓ inflamação acneica em: - 25%, 1 semana pós tratamento; - 53%, 4 semanas pós tratamento; - 60%, 8 semanas pós tratamento.
Denda; Fuziwara, 2008	<i>In vivo</i> (camundongo)	430-510 550-670 490-560 400-670	20 W por 1 hora		5	Uma vez	Recuperação da barreira cutânea: - Luz azul retardou; - Luz vermelha acelerou; - Luzes verde e branca: não tiveram efeito.
Barolet et al., 2009	<i>In vitro</i>	660	50	4	2,5	Pulsada (500 ms on/ 150 ms off)	↑ pró-colágeno I ↓ MMP-I ↓ rugosidade da pele
Liebman et al., 2010	<i>In vitro</i>	632 648 850 940 412 419 426 453	NA	0 – 100	NA	3 vezes, com intervalo de 24 h.	632, 648, 850 e 940 não apresentaram impacto na proliferação celular, nem em apoptose. 412, 419, 426 e 453 nm: ↓ no número de células viáveis, de maneira dose-dependente; sem diferenças na liberação de IL-8, comparado ao controle não irradiado 453 nm: ↑ diferenciação de queratinócitos
Souza et al., 2010	<i>In vivo</i>	460 530 660	22	10	NA	7 dias	530 e 660 nm: ↑ proliferação fibroblastos 460 nm: nenhuma diferença na proliferação de fibroblastos.
Wheeland and Dhawan, 2011	<i>In vivo</i>	425	NA	29	NA	2 vezes ao dia, por 8 semanas (em conjunto com sabonete contendo ácido salicílico)	Após 8 semanas, 90% dos indivíduos reportaram melhora na aparência de sua pele, com 86% indicando este tratamento com LED mais suave que outros.
Kleinpennig et al., 2012	<i>In vivo</i>	425	50	60	NA	20 min diários por 4 semanas	↓ níveis de descamação da pele ↓ níveis de eritema
Esmaeelinjad; Bayat, 2013	<i>In vitro</i>	632,8	0,66	0,5 1,0 2,0	15	Uma vez ao dia, por três dias	↑ IL-6 ↑ bFGF

Autores e Ano	Tipo	λ (nm)	Densidade de potência (mW/cm ²)	Fluência (J/cm ²)	D (cm)	MI	Resultados
Lanzafame et al., 2013 e 2014	<i>In vivo</i>	655	Não descrito	67,3	NA	Uma vez ao dia por 60 dias	35% de aumento no crescimento capilar de pacientes homens com alopecia; 37% de aumento no crescimento capilar de pacientes mulheres com alopecia
Kim et al., 2014	<i>In vitro</i>	633	0,005 0,05	NA	NA	24 horas ou 72 horas seguidas	↑ pró-colágeno tipo I após 72 horas a 0,05 mW/cm ² ↓ MMP-1 e -2, IL-1A e COX2 após 72 horas a 0,05 mW/cm ²
Kerpers et al., 2014	<i>In vivo</i>	627 945	70 110	7	NA	3 dias 7 dias	↑ pró-colágeno tipo I
Jung et al., 2015	<i>In vitro</i>	430 e 630	30 65	5 10 20 40	10	A cada dois dias, por seis dias.	Azul: ↓ diacilglicerol ↓ ácidos graxos livres Vermelho: ↓ esqualeno ↓ diacilglicerol ↓ ácidos graxos livres
Mamalis et al., 2015	<i>In vitro</i>	415	35	10 - 80	NA	Uma vez	↓ proliferação de fibroblastos; ↓ velocidade de migração ↑ níveis de ROS
Catao MHCV et al., 2016	<i>In vivo</i>	520	NA	240	NA		↓ infiltração de células inflamatórias;
Cho et al., 2016	<i>In vivo</i>	415 525 660 830	4,23 3,85 2,42 24,72	10 por sessão	NA	2x/ semana por duas semanas	↓ infiltração de células inflamatórias; ↓ IL-4 e INF-r ↓ níveis séricos de IgE (525 nm apenas)
Kim et al., 2016	<i>In Vitro e In vivo</i>	410 480 525 595 630 850	Não descrito	In vitro: 0 ~ 10 In vivo: 0 ~ 200	10	Uma vez	590 e 630 nm: ↑ colágeno I e III ↓ MMP 1 e 2 590 nm: ↓ ERK, cJun e cFos
Li et al., 2016	<i>In vivo</i>	630 460	50	45 90	15	Uma vez	Luz Vermelha: ↑ área de cicatrização em 12 dias, após 30 min irradiação; Luz Azul: não ↑ área de cicatrização até 21 dias após irradiação de 30 min; Luz vermelha: ↑ EGF, FGF, CD31 e Ki67

Autores e Ano	Tipo	λ (nm)	Densidade de potência (mW/cm ²)	Fluência (J/cm ²)	D (cm)	MI	Resultados
Sun et al., 2018	<i>In vitro</i>	425 625	4,5 mW por 30 ou 60 min		10	Uma vez	625 nm: ↓ níveis de ROS ↓ níveis de COX-2 e PGE ₂ 425 nm: Sem efeitos nos níveis de ROS nem dos mediadores inflamatórios.
Fernandes Neto et al., 2019	<i>In vivo</i>	470	NA	50	NA	28 seg x 4 aplicações	↑ angiogênese ↑ re-epitelização
Bonnans et al., 2020	<i>In vitro</i> e <i>ex vivo</i>	415 470 415+ 470	Isolados: 3 (<i>in vitro</i>) 5 (<i>ex vivo</i>) Conjunto: 100	NA	10	10 min 2x/semana por 2 semanas; 6 min, 1x/semana por 4 semanas	↓ sinais de acne ↑ expressão de ROS
Simões et al., 2020	<i>In vivo</i>	520 630	180 300	240 36	NA	Dose única	520 nm: ↑ angiogênese ↑ número de miofibroblastos 630 nm: ↑ re-epitelização ↑ índice de retração da ferida

5 MATERIAL E MÉTODO

5.1 Cultura e manutenção de fibroblastos

Foram utilizados neste estudo fibroblastos murinos, criopreservados, originários de tecido conjuntivo linhagem L929 fornecidos pela Gibco®. O criotubo contendo as células foi retirado do nitrogênio líquido e submergido até a metade em banho maria a 37°C até completo descongelamento. Em seguida, 20 µL da suspensão celular foi diluída em 20 µL de solução de azul de Trypan para determinação do número de células viáveis por mL. O conteúdo foi diluído a uma concentração de $1,25 \times 10^4$ células viáveis/mL em meio DMEM (Thermo Fischer) contendo 10% v/v de SFB (Thermo Fischer), 1% de glutamina 0,2M (LGC) e 1% v/v penicilina/estreptomicina (Thermo Fischer), a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ em uma incubadora ESCO. Todas as soluções utilizadas na cultura foram preparadas com água deionizada em sistema Milli-Q™ *Water System* (Millipore Corp., Bedford, MA, EUA) e, posteriormente, filtradas em sistemas de filtros (TPP).

5.2 Irradiação das células com LED (light-emitting diodes)

Para a irradiação das células em cultura, foi utilizada uma Biotable contendo 54 LEDs modelo 5050 SMD, idealizada pela autora deste estudo em conjunto com sua orientadora e com o Professor Dr. Alessandro Correa Mendes, do laboratório LASER, UNIVAP. Tal aparato não existe em formato comercial e seu desenvolvimento e montagem foi parte dos objetivos deste estudo. As diferentes combinações de luzes utilizadas estão descritas na tabela 2 e as fluências de cada ensaio, na tabela 3.

Tabela 2: Resumo do plano experimental com as diferentes combinações de LED.

Etapa	LED utilizado
1	Verde sozinho
2	Verde + Azul
3	Verde + Vermelho
4	Verde + Azul + Vermelho

Fonte: Própria autora.

Tabela 3: Diferentes fluências utilizadas, por ensaio.

	Azul de Trypan	de Micronúcleo	ERO	Conteúdo Proteico
Fluências	4 J/cm ² 40 J/cm ² 80 J/cm ²	40 J/cm ²		

Fonte: Própria autora.

5.3 Avaliação da viabilidade celular pelo Teste de exclusão por Azul de Trypan

Os fibroblastos foram plaqueados em 5 poços de uma placa de 96 poços, em uma densidade de 1×10^4 células/poço e, após 48 horas, foram irradiados de acordo com a tabela 4 abaixo. Um grupo de células foi mantido sem irradiação para controle negativo.

Tabela 4: Primeira etapa, irradiação para screening da viabilidade celular através de Azul de Trypan

LED(s) utilizado(s)	Fluências
Verde	
Verde + Azul	4 J/cm ² 40 J/cm ² 80 J/cm ²
Verde + Vermelho	
Verde + Vermelho + Azul	

Fonte: Própria autora.

A avaliação foi realizada 24h após as irradiações. Para isso foram adicionados 50 µl de solução de azul de Trypan (Sigma®) a 0,2%, por 5 minutos, e 150 µl de *phosphate-buffered saline* (PBS). Após homogeneização, as células foram fotografadas por meio de câmera acoplada a microscópio óptico invertido (Zeiss® - Axio Vert A1) em aumento de 10x, sendo selecionados 5 campos aleatórios em cada poço, totalizando 25 campos analisados por condição de irradiação. O experimento foi feito em duplicata, resultando em 50 contagens para cada condição estudada e controle negativo. Foram contadas células mortas (quando retida coloração azul) e vivas (células não coradas) de cada grupo. O experimento foi realizado em duplicata e a análise dos dados considerou a razão entre células mortas e células viáveis. A análise estatística foi realizada pelo método de *one-way* ANOVA seguida de Tukey.

5.4 Análise de Genotoxicidade por Micronúcleo

As células foram plaqueadas em 3 poços, sobre lamínulas, a uma densidade de 2×10^4 células/poço em placas de 24 poços e, após 48 horas, foram irradiadas de acordo com as combinações descritas na Tabela 2, porém apenas com fluência de 40 J/cm². O ensaio foi realizado 24 horas após a irradiação. Primeiramente, as células foram lavadas com PBS e, em seguida, fixadas com paraformaldeído a 4% em PBS *overnight*, em geladeira. As lâminas foram preparadas com três pontos contendo 5 µL do reagente ProLong™ Diamond Antifade Mountant with DAPI (4',6-Diamino-2-Phenylindole) (Invitrogen™). As lamínulas foram retiradas das placas multipoços e colocadas invertidas em cada um dos pontos com o reagente. As lâminas foram analisadas em microscópio confocal (Zeiss® LSM700) em aumento de 40x, sendo selecionados 10 campos aleatórios de cada lâmina. O resultado é apresentado na forma de frequência, sendo esta calculada pela razão entre o número de células apresentando micronúcleo e o número de células total. O critério de identificação utilizado foi o descrito por Tikenko-Holand, Moore e Smith (1994), e a análise estatística foi realizada utilizando software Minitab.

5.5 Detecção da formação de espécies reativas de oxigênio

As células foram plaqueadas em uma densidade de 4×10^3 células/poços. Elas foram submetidas à irradiação de acordo com as combinações descritas na Tabela 2, porém apenas com fluência de 40 J/cm^2 . A condição compreendendo a combinação de luzes verde e azul, na fluência de 80 J/cm^2 foi utilizada como controle positivo de emissão de fluorescência. Imediatamente após a irradiação, as células foram incubadas com o marcador 2', 7'-dichlorodihydroflorescein diacetate ($\text{H}_2\text{DCF-DA}$, Sigma) a $50 \mu\text{M}$ por 30 minutos a temperatura ambiente, sendo em seguida lavadas com PBS. A fluorescência foi monitorada pelo leitor de placas Synergy™ HT (Bio-Tek Instruments), com excitação a 485 nm e emissão em 530 nm. O experimento foi conduzido em duplicata, sendo que cada combinação de luzes e os controles negativo e positivo foram executados em cinco poços, totalizando dez contagens para cada condição.

5.6 Análise do conteúdo proteico dos fibroblastos por eletroforese

As células foram plaqueadas em 5 poços, a uma densidade de 2×10^5 células/poço em placas de 24 poços, totalizando 1×10^6 células por condição. Após 48 horas, foram submetidas à irradiação. Após 24 horas da irradiação, foi realizada a extração do conteúdo proteico para posterior análise por SDS-PAGE (Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) com dodecil- sulfato de sódio).

5.6.1 Extração e quantificação de proteínas

Primeiramente as células foram lavadas com PBS duas vezes e as placas foram colocadas sob gelo. Foi adicionado 1 mL de tampão RIPA (*Radioimmunoprecipitation assay buffer*: 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 1% NP-40, 1% Na-deoxicolato, 0,1% SDS) por placa e incubadas por 15 min a 4°C , sob agitação. Em seguida, o conteúdo foi centrifugado a 15000 rpm por 10 min a 4°C e o sobrenadante foi estocado a -80°C para posterior quantificação, utilizando o método de Bradford de acordo com as instruções do Kit Bio-Rad: 200 μL reagente Bio-Rad, 800 μL H_2O , 2 – 20 μL de amostra.

5.6.2 Eletroforese SDS-PAGE (Sodium Dodecyl-Sulfate – Polyacrilamide Gel Electrophoresis)

Foram preparados: gel de corrida a 12% de acrilamida [40% de mix acrilamida + bis-acrilamida 30%]; 33% H₂O; 25% Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8); 1% SDS 10%; 1% persulfato de amônio 10%, 0,004% TEMED (Tetramethylethylenediamine), e gel de empilhamento à 5% de acrilamida (16,75% de mix acrilamida + bis-acrilamida 30%; 67,5% H₂O; 12,5% Tris-HCl 1,0 M (pH 6,8); 1% SDS 10%; 1% persulfato de amônio 10%, 0,04% TEMED). Após a completa polimerização do gel, os lisados proteicos e um controle de massa molecular (SeeBlue Pre-Stained Standard, ThermoFischer) foram aplicados e submetidos à eletroforese a 100 V por 1 hora. Especificamente para o colágeno, foi aplicada também ao gel uma amostra de Colágeno tipo I isolada e purificada como padrão de migração (Sigma, C7661). Os polipeptídeos separados pelos géis de SDS-PAGE foram corados com Coomassie Brilliant Blue R250 (Thermo Fischer) para observação do padrão de distribuição das proteínas nas diferentes amostras estudadas.

6 RESULTADOS

6.1 APARATO EMISSOR DE LUZ

6.1.1 Construção do aparato emissor de luz

O aparato de irradiação (Figura 7) foi idealizado e construído para operação dentro da Universidade do Vale do Paraíba, em uma colaboração com o Professor Alessandro Mendes. O arcabouço foi desenhado por este grupo, e posteriormente impresso em impressora 3D a partir de filamentos de PLA (ácido poliláctico) de 1,75 mm. Com relação aos dimensionais, o aparato foi projetado para irradiação de placas de cultura de células de 24 e 96 poços, em três diferentes distâncias entre o objeto de estudo e a fonte luminosa (1 cm, 2,5 cm e 4 cm). A irradiância recebida pelo objeto de estudo é dependente desta distância a que ele se encontra da fonte luminosa, então esta característica no aparato permite maior flexibilidade para uso com diferentes protocolos. Para este estudo, utilizamos a distância de 1 cm. Além disso, o aparato comporta o sistema elétrico e eletrônico, incluindo plataforma Arduino UNO, embutidos e conta com painel de LED e três botões para operação.

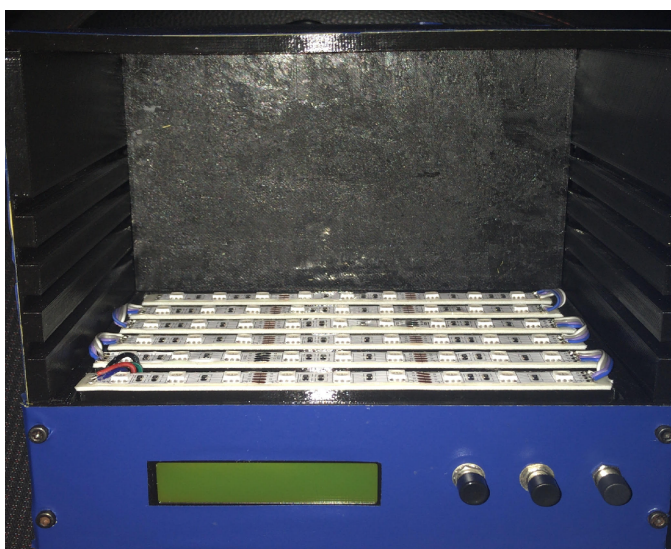
Figura 7: Visão externa do aparato. (A) Visão frontal, a interface com o usuário com três botões de comando (aumentar intensidade; diminuir intensidade; seletor) e painel em LCD. (B) Visão lateral e; (C) Visão traseira, com entrada de energia e porta USB para a programação (interface Arduino / Computador).



Fonte: Própria autora.

A emissão de luz ocorre por meio de fitas de LED modelo 5050 SMD, compostos por uma mistura de Alumínio-Gálio-Índio-Fósforo (AlGaInP). São seis fileiras, contendo 9 LEDs cada, totalizando 54 LEDs, conforme mostrado na figura 8.

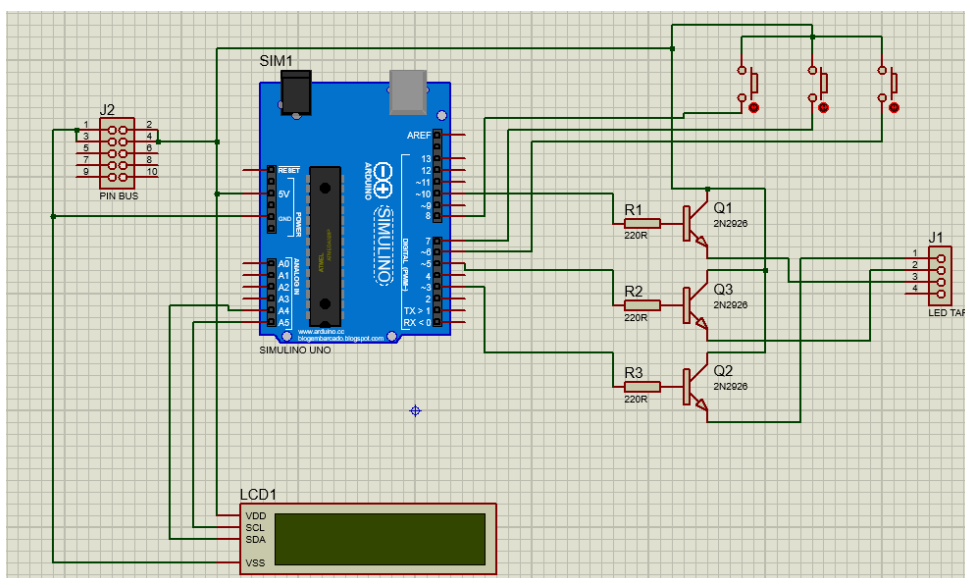
Figura 8: Visão detalhada do interior do aparato. Na parte inferior, em branco, estão as 6 fitas contendo 9 LEDs cada. Nas paredes laterais é possível verificar nichos para encaixe do suporte às placas de 24 e 96 poços. Abaixo das fileiras de LEDs encontram-se embutidos os sistemas elétrico e eletrônico



Fonte: Própria autora.

A fita de LED possui três canais independentes de condução do sinal elétrico (RGB), e seu sistema eletrônico, esquematizado na Figura 9, foi montado de forma a permitir o controle independente da emissão de luz nos comprimentos de onda azul (455 nm), vermelho (630 nm) e verde (520 nm). Toda a programação do sistema foi realizada em C na plataforma Arduino UNO. O programa de computador foi registrado junto ao INPI, com data de publicação em 27 de agosto de 2019, com o título “Software para operar um equipamento de emissão de luz”, sob o número: BR-512019001891-5. A cópia deste certificado encontra-se no Anexo 1.

Figura 9: Representação esquemática do sistema eletrônico que controla o aparato de irradiação celular.



Fonte: Própria autora.

O desenho e operação do aparato foram depositados junto ao INPI, em 19 de novembro de 2020, na modalidade Patente de Invenção, sob o título “APARATO DE IRRADIAÇÃO LUMINOSA”, processo número BR 10 2020 023694 6. A cópia deste peticionamento encontra-se no Anexo 2.

6.1.2 Caracterização do aparato de irradiação.

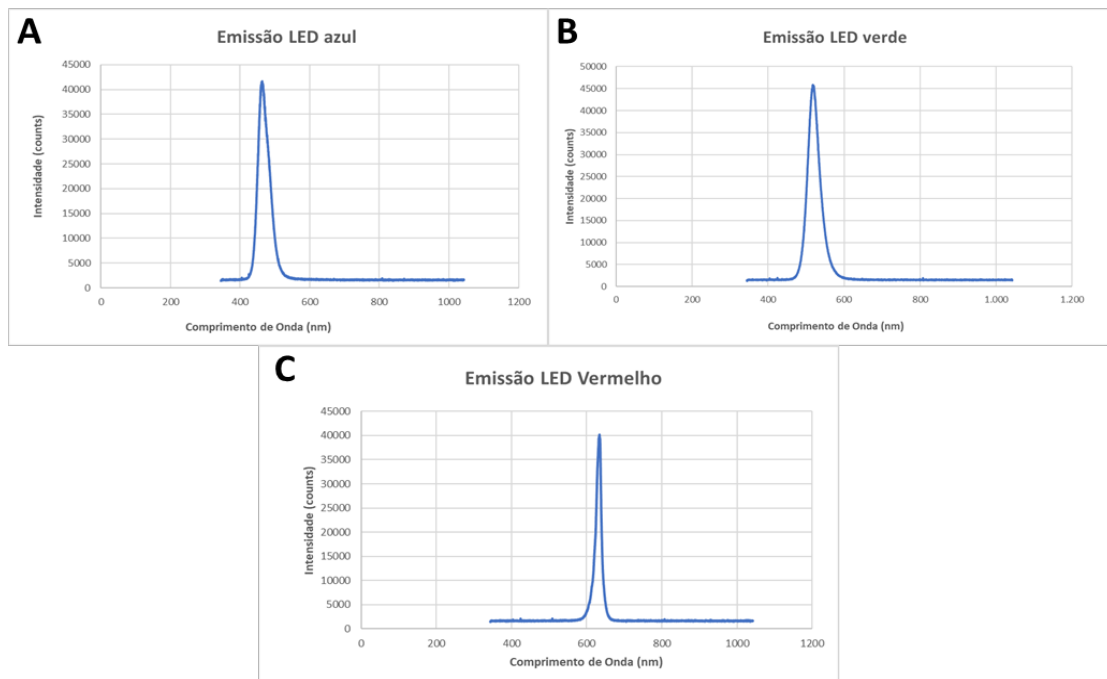
6.1.2.1 Determinação do comprimento de onda emitido por cada um dos LEDs e suas combinações

O aparato foi caracterizado em relação (1) ao comprimento de onda emitido pelos diferentes canais e (2) à densidade de potência óptica nas diferentes distâncias possíveis entre *espécimen* e fonte de luz.

Para a detecção do comprimento de onda, foi utilizado o espectrofotômetro portátil modelo USB 4000 da Ocean Optics. Este equipamento é responsivo a estímulos entre 200 a 1100 nm, com resolução de $\pm 1,5$ nm. Foram realizadas 7 medições, considerando os três canais operando de forma isolada (verde / azul / vermelho), e em quatro combinações (verde e azul; verde e vermelho; azul e vermelho; verde, azul e vermelho). O resultado foi capturado em software próprio da Ocean

Optics e depois migrado em forma de tabela para a construção de gráficos, que estão apresentados na figura 10. É possível em todos eles evidenciar os picos de emissão, sendo a cor azul em 455 nm; a cor vermelha em 630 nm; e a cor verde em 522 nm.

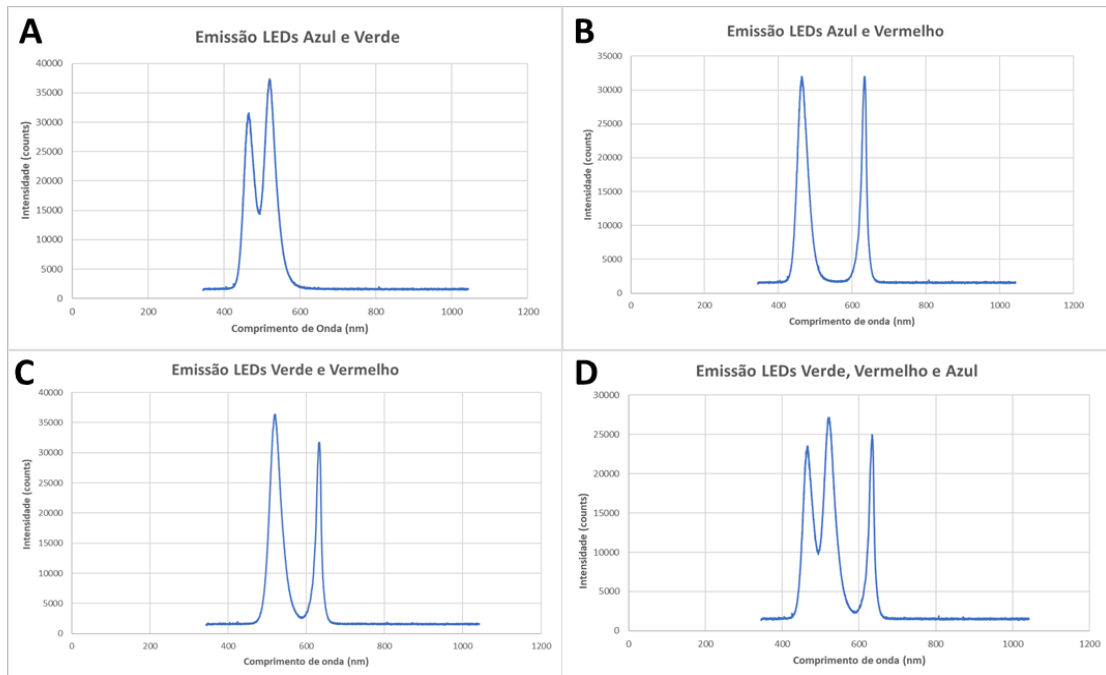
Figura 10: Gráficos demonstrando a distribuição de intensidade de luz por comprimento de onda dos três canais operando de forma isolada: (A) luz azul; (B) luz verde e (C) luz vermelha.



Fonte: Própria autora.

Quando analisados em combinação, os picos de emissão se mantiveram muito próximos aos descritos acima, com diferenças apenas dentro da resolução do equipamento ($\pm 1,5$ nm). Para esta análise, as luzes foram ligadas de forma concomitante, seja em combinações de pares (Figura 11 A, B e C) ou o trio completo (Figura 11 D).

Figura 11: Gráficos demonstrando a distribuição de intensidade de luz por comprimento de onda dos três canais operando de forma concomitante: (A) Luzes azul e verde; (B) luzes azul e vermelha; (C) luzes vermelha e verde; e (D) luzes azul, verde e vermelha.



Fonte: Própria autora.

6.1.2.2 Determinação da densidade de potência óptica (irradiância) emitida por cada um dos LEDs e suas combinações

Para determinação da densidade de potência óptica foi utilizado o equipamento PM100D com sensor S120VC (Thorlabs), que possui capacidade de leituras até 50 mW de potência para comprimentos de onda compreendidos entre 200 e 1100 nm, com erro de $\pm 3\%$, segundo manual. A sonda foi colocada dentro do aparato e as leituras foram feitas nas três alturas desenhadas para uso, conforme descrito no item 5.1.1: 1 cm, 2,5 cm e 4 cm. Em cada uma dessas alturas, foram feitas três medidas em pontos diferentes, para capturar possíveis heterogeneidades de emissão. A sonda foi conectada a uma interface LCD, onde a potência foi capturada. Posteriormente, este dado foi convertido em densidade de potência considerando-se a janela de leitura da sonda, que é de $0,71 \text{ cm}^2$, segundo informações do fabricante.

Para as alturas de 2,5 cm e 4,0 cm, não foi possível estabilizar a leitura. Como a sonda tem uma janela de leitura muito pequena, é de fato mais indicada para leituras individualizadas dos LEDs, ao invés de leitura da luz já espalhada. A densidade de

potência obtida para cada comprimento de onda, e suas combinações, na distância de 1 cm entre o objeto e a fonte luminosa estão descritas na tabela 5, abaixo.

Tabela 5: Resultados de irradiância obtidos para a emissão dos 54 LEDs, a 1 cm da fonte luminosa, nos diferentes comprimentos de onda estudados de forma isolada e em combinações

LEDs	Densidade de Potência (mW/cm²)
Azul	156,3
Verde	105,2
Vermelho	90,7
Azul e Verde	182,9
Azul e Vermelho	190,6
Verde e Vermelho	93,0
Azul, Verde e Vermelho	152,4

Fonte: Própria autora.

6.1.2.3 Determinação dos tempos de irradiação para cada uma das fluências a ser estudada

Baseado no que já existe de literatura para os LEDs vermelho, verde e azul, foram determinadas três fluências distintas para uso neste estudo. A partir dos valores de fluências e os dados de densidade de potência expostos no item 6.1.2.2, é possível calcular o tempo de irradiação para cada condição a partir da equação abaixo e os resultados encontram-se detalhados na tabela 6.

$$t (s) = \frac{\text{fluência} \left(\frac{J}{cm^2} \right)}{\text{densidade de potência} \left(\frac{mW}{cm^2} \right)} \times 1000$$

Tabela 6: Tempos de irradiação calculados a partir da irradiância de cada LED ou combinação para atingir a fluência desejada.

LED(s)	Densidade de Potência	Fluência Irradiada	Tempo de irradiação
Verde	105 mW/cm ²	4 J/cm ²	38"
		40 J/cm ²	6' 20"
		80 J/cm ²	12' 40"
Verde + Azul	180 mW/cm ²	4 J/cm ²	22"
		40 J/cm ²	4' 39"
		80 J/cm ²	9' 18"
Verde + Vermelho	93 mW/cm ²	4 J/cm ²	43"
		40 J/cm ²	7' 10"
		80 J/cm ²	14' 20"
Verde + Vermelho + Azul	150 mW/cm ²	4 J/cm ²	26"
		40 J/cm ²	4' 23"
		80 J/cm ²	8' 46"

Fonte: Própria autora.

6.1.2.4 Verificação da temperatura de operação

Para garantir que o aquecimento natural do equipamento não prejudicasse a obtenção dos resultados por superaquecimento, foi realizada uma aferição de temperatura após diferentes tempos do início da operação. Para tal medição, uma sonda foi mantida dentro do aparato, conectada por um cabo a um leitor LCD mantido do lado de fora, onde foi possível fazer as leituras. Foi escolhida a condição de LEDs Azul e Vermelho ligados em combinação, uma vez que esta foi a que apresentou a maior densidade de potência (190,6 mW/cm²). Os resultados encontrados estão demonstrados na tabela 7 abaixo. O máximo de temperatura encontrado foi 36,1°C, após uma hora de equipamento ligado ininterruptamente. Assim sendo, em se mantendo o aparelho em ambiente externo controlado em torno de 20°C, não é necessário acoplar refrigeração ao exclusiva para o mesmo.

Tabela 7: Temperatura dentro do equipamento em funcionamento em diferentes tempos

Tempo (min)	Temperatura (°C)
0	20,4
5	23,7
15	29,0
30	33,0
60	36,1

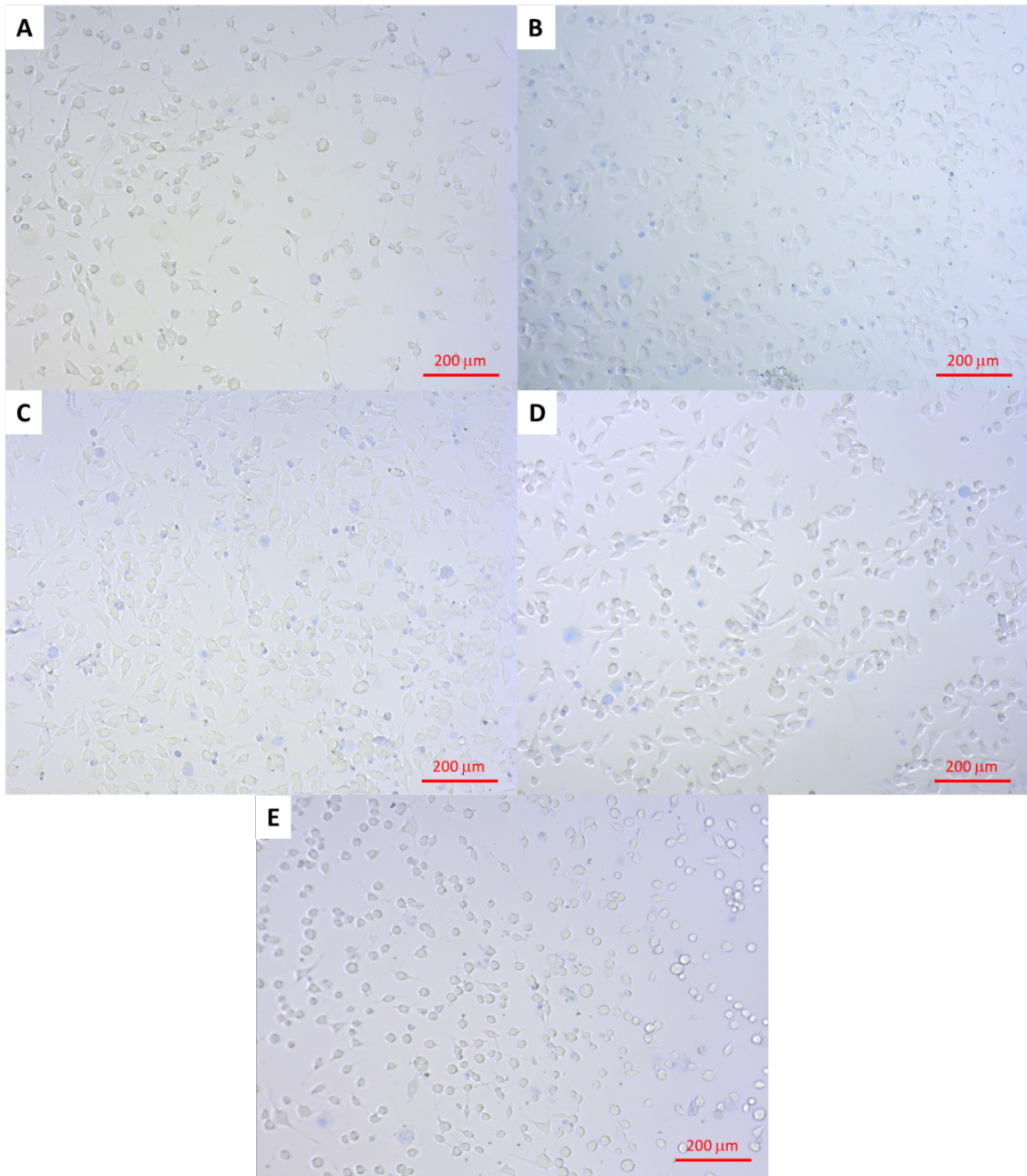
Fonte: Própria autora.

6.2 ESTUDO DOS EFEITOS DA IRRADIAÇÃO EM FIBROBLASTOS

6.2.1 Avaliação da viabilidade celular pelo Teste de exclusão por Azul de Trypan

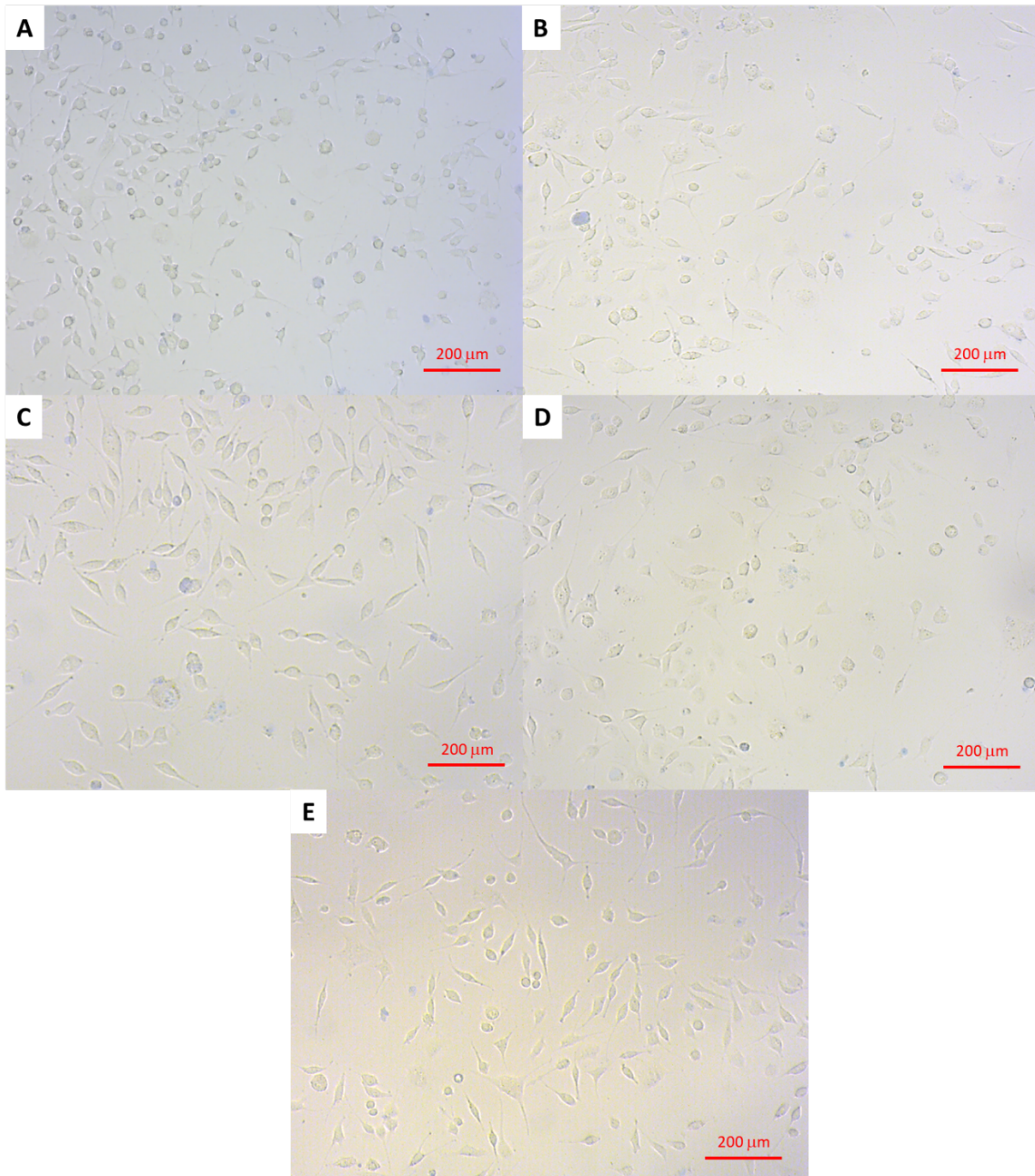
A análise através de microscopia óptica permitiu identificar efeitos negativos na viabilidade celular quando aplicada a fluência de 80 J/cm², independente da combinação de cores utilizada. Na Figura 12 é possível visualizar de forma qualitativa este resultado, onde observa-se uma quantidade muito maior de células marcadas com azul de Trypan nos grupos irradiados (Figura 12 B, C, D e E) *versus* o controle não irradiado (Figura 12 A). Já nas figuras 13 e 14, que representam respectivamente os grupos irradiados com fluências 4 J/cm² e 40 J/cm², não foram notadas diferenças, comparado ao controle não irradiado.

Figura 12: Microscopia óptica de fibroblastos submetidos a teste de exclusão por azul de Trypan após irradiação com diferentes combinações de LED. (A) Controle não-irradiado; (B, C, D e E) Irradiação a 80 J/cm² com LED (B) verde ; (C) Verde+azul; (D) verde+vermelho; (E) verde+vermelho+azul



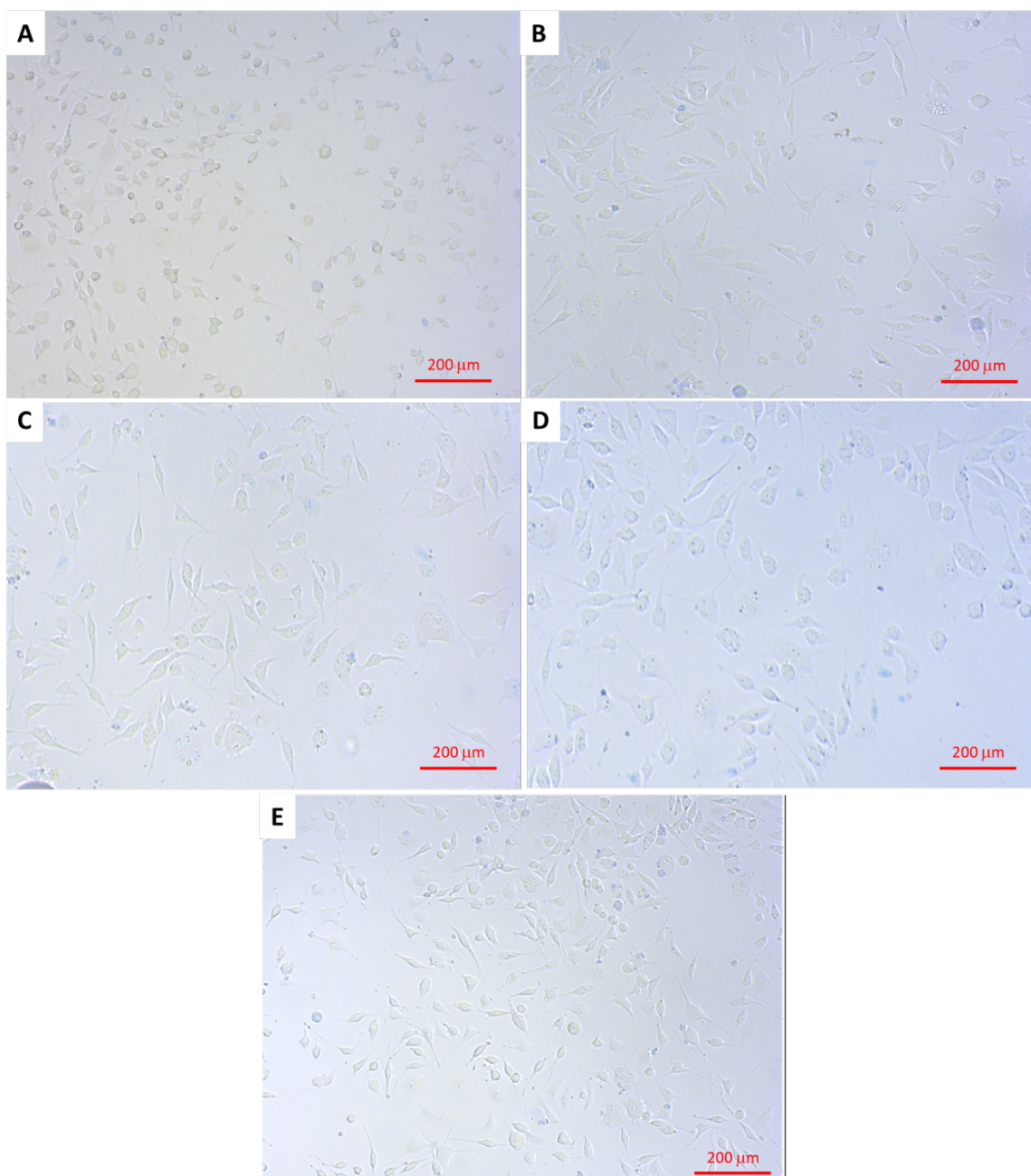
Fonte: Própria autora.

Figura 13: Microscopia óptica de fibroblastos submetidos a teste de exclusão por azul de Trypan após irradiação com diferentes combinações de LED. (A) Controle não-irradiado; (B, C, D e E) Irradiação a 4 J/cm² com LED (B) verde ; (C) Verde+azul; (D) verde+vermelho; (E) verde+vermelho+azul



Fonte: Própria autora.

Figura 14: Microscopia óptica de fibroblastos submetidos a teste de exclusão por azul de Trypan após irradiação com diferentes combinações de LED. (A) Controle não-irradiado; (B, C, D e E) Irradiação a 40 J/cm² com LED (B) verde ; (C) Verde+azul; (D) verde+vermelho; (E) verde+vermelho+azul

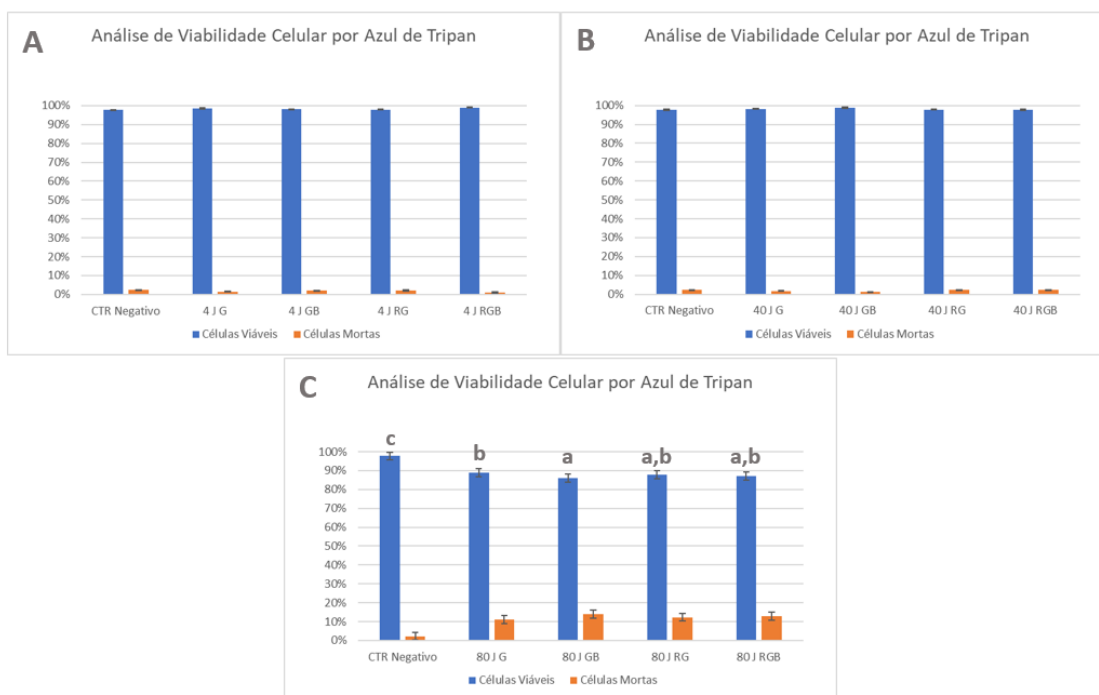


Fonte: Própria autora.

Como é possível observar nos gráficos apresentados na Figura 15, para as fluências de 4 J/cm² e 40 J/cm², a mortalidade celular ficou em torno de 1 – 2%, apresentando-se estatisticamente similares ao controle negativo, que não recebeu qualquer irradiação. Os resultados também demonstram que não há diferença no nível de mortalidade celular dependendo da luz, ou combinação de luzes utilizada.

Para a fluência de 80 J/cm², a mortalidade aumentou significativamente, atingindo valores de 11% a 14%, como mostrado na figura 15. A análise estatística pelo *one-way ANOVA* demonstra que esta diferença é estatisticamente significativa ($p < 0,01$) quando comparadas às condições irradiadas *versus* controle negativo, e que também houve diferença estatisticamente significativa na mortalidade celular a depender da combinação de luzes utilizada ($F(3,96) = 5,52$ e $p < 0,01$). Por meio da análise *post-hoc* utilizando o método de Tukey, é possível verificar que os grupos que receberam luz verde e luz verde combinada com azul são similares aos demais grupos, porém não são similares entre si (Tabela 8).

Figura 15: Análise da viabilidade celular pelo teste de exclusão por com Azul de Trypan em função das diferentes fluências e combinações de luz utilizadas. (A) fluência de 4 Jcm²; (B) fluência de 40 J/cm²; e (C) fluência de 80 J/cm². No gráfico C, as letras minúsculas representam o agrupamento utilizando *one-way ANOVA* com Tukey. Combinação de luzes utilizadas: (G) verde; (GB) verde e azul; (RG) verde e vermelho; (RGB) verde, vermelho e azul.



Fonte: Própria autora.

Tabela 8: Análise de grupamentos por método Tukey para determinação de diferenciação significativa entre as combinações de luz utilizadas

Factor	N	Mean	Grouping
80 J Green Blue	50	4,400	A
80 J Red Green Blue	50	4,240	A B
80 J Green Red	50	3,960	A B
80 J Green	50	3,280	B
Neg	50	0,840	C

Fonte: Própria autora.

Com relação às diferenças da mortalidade celular em decorrência das fluências aplicadas (Controle Negativo, 4 J/cm², 40 J/cm² e 80 J/cm²), a análise via *one-way* ANOVA demonstrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($F(12,632) = 57,24$ e $p < 0,01$).

Para determinar a variável responsável por esta diferença, foi realizado o teste de Tukey, cujos resultados estão descritos na Tabela 9. Todas as combinações de luzes utilizadas nas fluências de 4 J/cm² e 40 J/cm² apresentaram comportamento similar ao Controle Negativo, enquanto todas as combinações, quando na fluência de 80 J/cm² foram agrupadas de forma distinta, evidenciando a significância estatística das diferenças encontradas entre as fluências utilizadas.

Fonte: Própria autora.

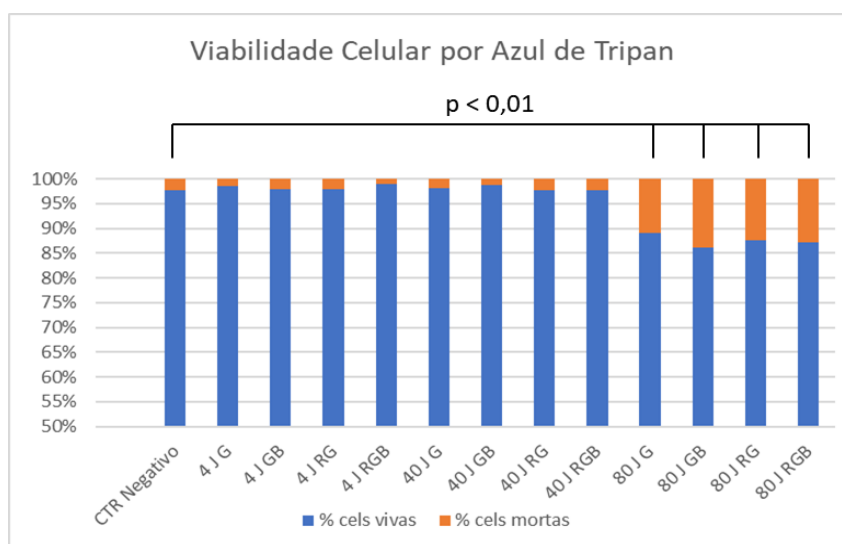
Tabela 9: Agrupamento das diferentes condições de irradiação das células resultante da análise realizada com teste de Tukey.

Factor	N	Mean	Grouping
80 J Verde + Vermelho + Azul	50	0,1461	A
80 J Verde + Azul	50	0,14256	A B
80 J Verde + Vermelho	50	0,1295	A B
80 J Verde	50	0,11182	B
40 J Verde + Vermelho + Azul	50	0,02481	C
Controle negativo	50	0,02258	C
4 J Verde + Azul	50	0,02224	C
4 J Verde + Vermelho	50	0,02185	C
40 J Verde + Vermelho	50	0,02141	C
40 J Verde	50	0,01765	C
4 J Verde	50	0,01568	C
40 J Verde + Azul	50	0,01413	C
4 J Verde + Vermelho + Azul	45	0,01120	C

Means that do not share a letter are significantly different.

O resultado final, contemplando informações de todos os grupos estudados, bem como as análises estatísticas realizadas está compilado no gráfico apresentado na Figura 16.

Figura 16: Representação gráfica de todos os resultados de Viabilidade Celular, com todos os grupos estudados, contemplando as diferentes combinações de luz e fluências.



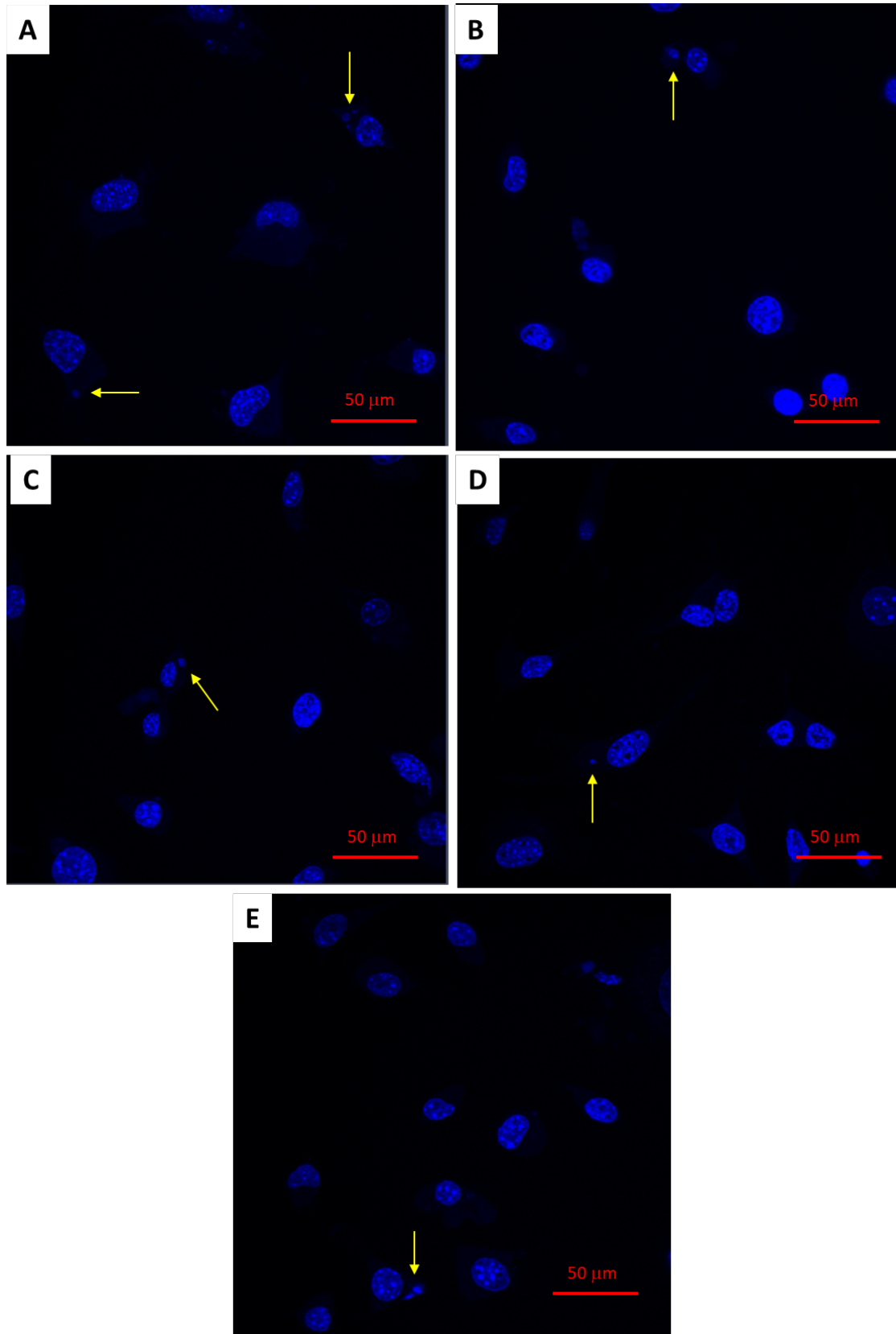
Fonte: Própria autora.

Com base neste resultado de viabilidade celular, o uso da fluência de 80 J/cm² foi descartado devido à alta mortalidade encontrada nesta condição, permanecendo as fluências de 40 J/cm² e 4 J/cm² como opções viáveis.

6.2.2 Análise de Genotoxicidade por Micronúcleo

A análise de genotoxicidade por micronúcleo não evidenciou diferenças entre os grupos irradiados e o controle não irradiado na fluência de 40 J/cm² como é possível observar de forma qualitativa na figura 17.

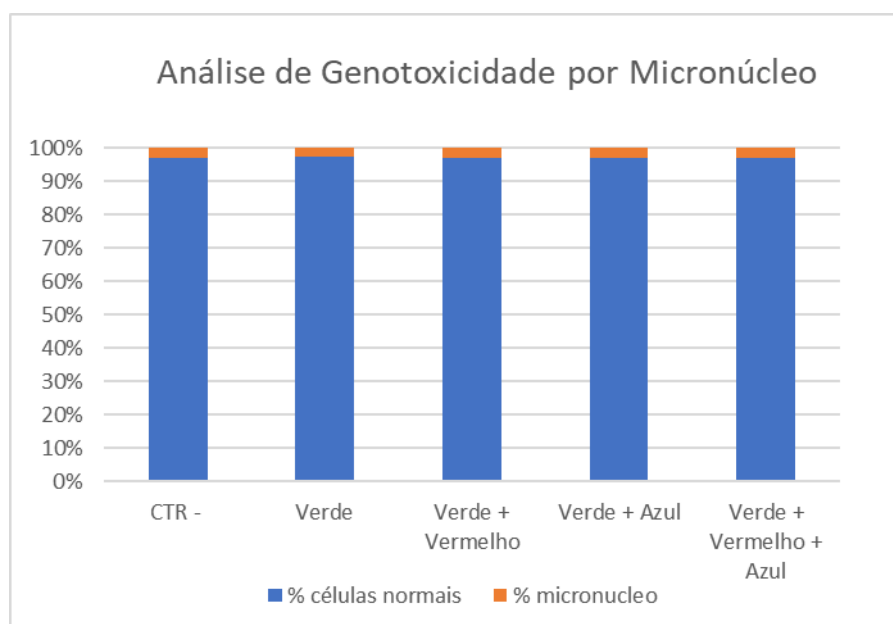
Figura 17: Microscopia confocal de fibroblastos submetidos a marcação com DAPI para análise da formação de micronúcleo (indicado pelas setas amarelas) após irradiação com diferentes combinações de LED. (A) Controle não-irradiado; (B, C, D e E) Irradiação a 40 J/cm² com LED (B) verde ; (C) Verde+azul; (D) verde+vermelho; (E) verde+vermelho+azul



Fonte: Própria autora.

O resultado apresentado na Figura 18 refere-se à média de dois experimentos independentes realizados. É possível constatar que, independente da combinação de luzes utilizada, os resultados foram similares ao controle sem irradiação ($p > 0,05$). Na condição de 40 J/cm^2 não foram encontrados efeitos adversos para genotoxicidade celular, a condição de 4 J/cm^2 não foi avaliada.

Figura 18: Análise de Genotoxicidade por marcação de Micronúcleo indicando não haver maior genotoxicidade na fluência de 40 J/cm^2 quando comparada ao controle, independente da combinação de luz utilizada. CTR -: Controle Negativo.

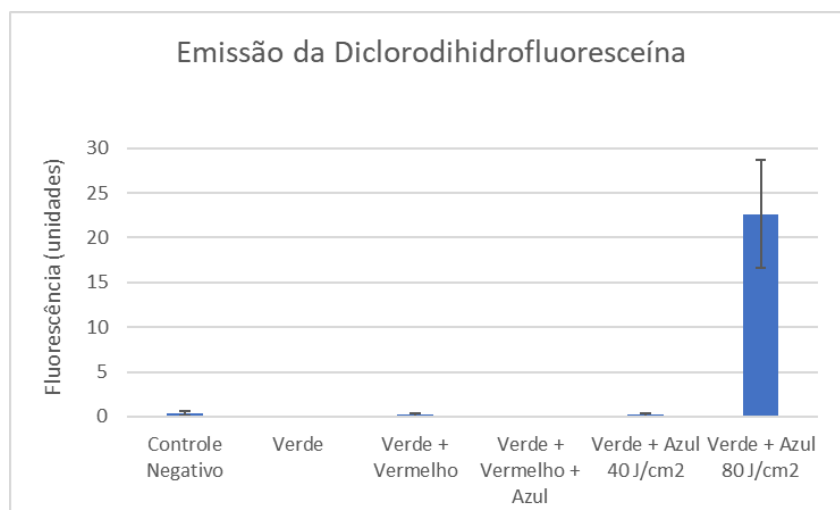


Fonte: Própria autora.

6.2.3 Detecção da formação de espécies reativas de oxigênio

Como é possível observar, nenhuma condição estimulou a emissão significativa de fluorescência, que é a medida indireta da formação de espécies reativas de oxigênio, mostrando-se similares ao controle negativo e significativamente diferentes do controle positivo ($p < 0,01$).

Figura 19: Análise da fluorescência de diclorodihidrofluoresceína, medida indireta de presença de radicais livres, após irradiação com diferentes combinações de luz a 40 J/cm². Controle negativo sem irradiação; condição Verde + Azul 80 J/cm² utilizada como controle positivo. * p < 0,01.



Fonte: Própria autora.

Para a condição de 40 J/cm² não foram encontrados níveis aumentados de espécies reativas de oxigênio comparados ao controle negativo, a condição de 4 J/cm² não foi analisada.

6.2.4 Análise do conteúdo proteico dos fibroblastos por eletroforese

A partir dos resultados de viabilidade e citotoxicidade celular, a fluência de 40 J/cm² foi escolhida para irradiar os fibroblastos a fim de explorar seu potencial de estimular a produção de fatores antienvhecimento. Os resultados da quantificação do conteúdo proteico extraído encontram-se na tabela 10.

Tabela 10: Quantificação do conteúdo proteico extraído por condição irradiada.

Condição	Ensaio # 1	Ensaio # 2
Controle Negativo	≥ 26 µg/mL	≥ 26 µg/mL
LED Verde 40 J/cm ²	23, 2 µg/mL	≥ 26 µg/mL
LEDs Verde e Azul 40 J/cm ²	25,0 µg/mL	24,5 µg/mL
LEDs Verde e Vermelho 40 J/cm ²	≥ 26 µg/mL	19,3 µg/mL
LEDs Verde, Azul e Vermelho 40 J/cm ²	≥ 26 µg/mL	≥ 26 µg/mL

Fonte: Própria autora.

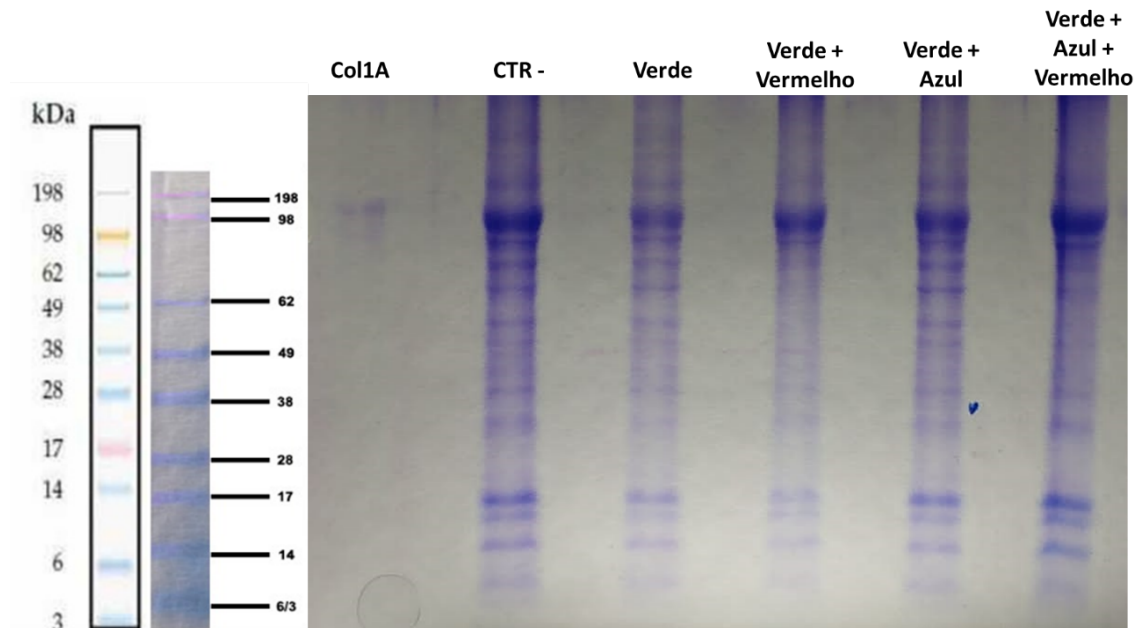
Este material, em conjunto com o padrão de de peso molecular, foi submetido à separação por peso molecular via SDS-PAGE. Nesta, a partir da análise da migração do controle de massa molecular, é possível determinar o peso molecular das diferentes bandas apresentadas no gel. Para isto, foram seguidas as instruções da Nota Técnica 3133 da BioRad. Primeiramente, foi determinada a migração relativa (R1) das diferentes bandas apresentadas pelo padrão de peso molecular, sendo esta:

$$R1 = \frac{\text{migração da banda (mm)}}{\text{migração do corante (mm)}}$$

Em seguida, a migração relativa de cada banda do padrão foi correlacionada ao log dos pesos moleculares descritos na especificação do mesmo, a saber: 198, 98, 62, 49, 38, 28, 17, 14, 6 e 3 kDa. A correlação gerou uma equação a partir da qual, por interpolação, as bandas desconhecidas das amostras estudadas puderam ter seu peso molecular estimado. Além deste padrão, foi utilizada proteína isolada de Colágeno tipo 1 (138 kDa) para confirmar a presença da mesma no *pool*.

A figura 20 apresenta o resultado encontrado para as diferentes condições de irradiação.

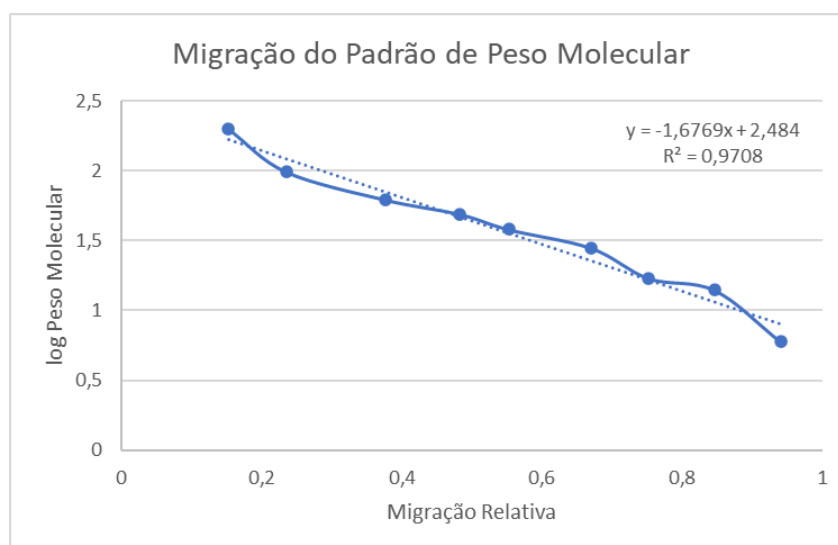
Figura 20: Gel de Poliacrilamida a 10% mostrando o conteúdo proteico dos fibroblastos submetidos a diferentes condições de irradiação, separado por peso molecular. Col1A: Colágeno tipo 1; CTR -: controle negativo.



..... Fonte: Própria autora.

A correlação entre a migração relativa das bandas e o logaritmo dos respectivos pesos moleculares gerou o gráfico apresentado na Figura 21 e a equação da reta apresentada foi utilizada para o cálculo das bandas apresentadas pelas amostras estudadas. Os resultados, que se encontram sumarizados na tabela 11, demonstram os achados de dois experimentos conduzidos de forma independente.

Figura 21: Gráfico apresentando a distância percorrida por cada fração do padrão de massa molecular a depender da distância percorrida no gel.



Fonte: Própria autora.

Tabela 11: Inferência da massa molecular apresentada pelas diversas bandas por interpolação do padrão.

Primeiro Gel		Segundo Gel	
Migração Relativa	Peso Molecular (kDa)	Migração Relativa	Peso Molecular (kDa)
0,153	193	0,141	201
0,226	131	0,235	126
		0,341	83
		0,412	63
0,447	55	0,447	55
0,471	50	0,506	44
0,541	38	0,541	38
0,588	32	0,612	29
0,800	14	0,765	16
		0,812	13
0,871	10	0,871	10
0,929	8		

Fonte: Própria autora.

As bases de dados UniProt e Pubmed foram utilizadas para busca por proteínas de interesse dentro dos pesos moleculares encontrados. No UniProt, foram feitas buscas utilizando-se as palavras chave: “collagen”, “laminin”, “elastin”, “fibroblast growth factor” e “matrix metalloproteinase”. “Actin” também foi pesquisada devido a

seu amplo uso como parâmetro para integridade celular. Os resultados foram filtrados por organismo (*Mus musculus*) e pela preferência por revisões feitas manualmente.

Utilizando-se a palavra chave “collagen”, foram encontrados 30 registros compreendendo as diferentes cadeias com pesos moleculares variando de 340 a 45 kDa. Buscando especificamente por colágeno tipo 1, foram encontrados dois registros: Colágeno tipo 1, alpha 1 (referência UniProt P11087), de 138,03 kDa e Colágeno tipo 1, alpha 2 (referência UniProt Q01149), de 129,5 kDa. A busca por “fibroblast growth factor” retornou 16 registros, sendo a grande maioria (14) com peso molecular entre 22 e 28 kDa. A busca por “laminin” retornou 6 registros, com pesos moleculares entre 129 e 197 kDa. A busca por “matrix metalloproteinase” retornou 21 resultados, com pesos moleculares entre 30 e 80 kDa. “Elastin” retornou um resultado com peso molecular de 72 kDa (referência UniProt P54320). Por fim, a busca por “actin” retornou um resultado, de aproximadamente 42 kDa (referência UniProt P60710).

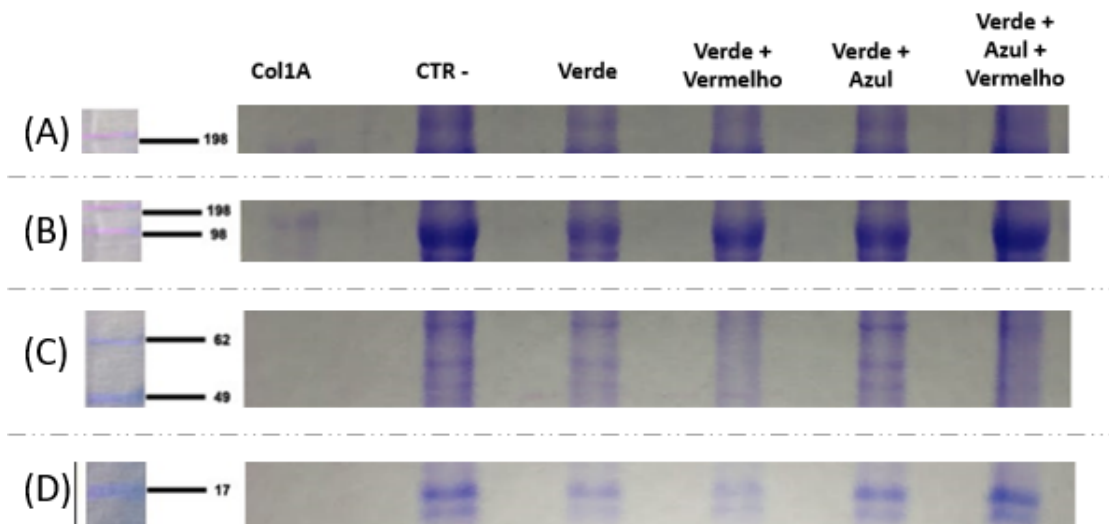
De todos os resultados encontrados, os mais próximos dos pesos moleculares encontrados no gel SDS-PAGE estão compilados na tabela 12. Na figura 22, apresenta-se o recorte do gel, evidenciando a correlação entre as bandas encontradas no gel, seu possível peso molecular.

Tabela 12: Resultado da busca na base de dados UniProt por proteínas com massa molecular de acordo com os dados aproximados determinados por SDS-PAGE

Peso Molecular (kDa)	Proteína Candidata	Referência UniProt
193 / 201	Laminina (197 kDa)	P02469 Q61292
126	Colágeno 1, alpha 2 (129,5 kDa) Colágeno 1, alpha 1 (138 kDa)	Q01149 P11087
83	Elastin (72kDa) Receptor FGF-3 (87 kDa)	P54320 Q61851
63	MMP-17 (64,3 kDa) MMP-21 (65,4 kDa) MMP-14 (66 kDa)	Q9R0S3 Q8K3F2 P53690
55 / 50	MMP1 Colagenase A (53,5 kDa) MMP1 Colagenase B (53,5 kDa)	Q9EPL6 Q9EPL5
44 / 38	Actina (42 kDa)	P60710
32 / 29	MMP-7 (29,8 kDa)	Q10738
16 / 14 / 13	Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF – 17 kDa) Acidic Fibroblast Growth Factor (aFGF – 17 kDa)	P11655 P61148
10 / 8	Não foi possível determinar	

Fonte: Própria autora.

Figura 22: Recortes do gel SDS-PAGE evidenciando a migração de diferentes pesos moleculares. (A) 193 / 201 kDa; (B) 126 kDa; (C) 50 – 65 kDa e (D) 13 – 16 kDa.



Fonte: Própria autora.

7 DISCUSSÃO

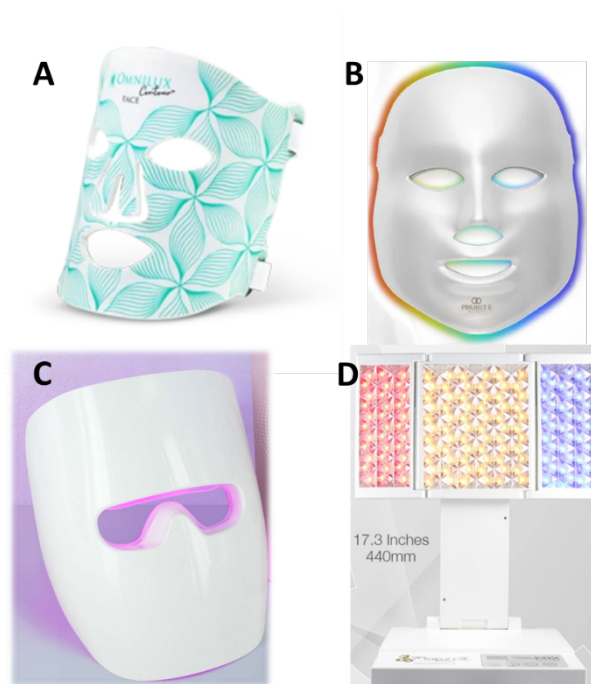
Já está bem estabelecido na literatura os efeitos de LED azul e vermelho em diferentes aspectos da saúde e integridade da pele, como aumento de produção de colágeno, diminuição de produção de metaloproteinases de matriz, combate à acne, dentre outros. (BAROLET *et al.*, 2009; KERPPERS *et al.*, 2014; KIM *et al.*, 2015; MAMALIS; GARCHA; JAGDEO, 2015; KIM *et al.*, 2016; SUN *et al.*, 2018; MOREIRA *et al.*, 2020). Isto desencadeou interesse em seu uso estético anti-envelhecimento e os equipamentos e respectivos protocolos, antes limitados a consultórios dermatológicos, atualmente encontram-se disponíveis para uso doméstico. Três marcas se sobressaem neste mercado com produtos chamados “máscaras faciais”: OMNILUX, JoLee, e PROJECT E. A promessa é de resultados comprovados, com preço acessível, manuseio simples e segurança para o usuário.

A maioria das máscaras emite em comprimento de onda na região do vermelho e infravermelho próximo e correlaciona seu uso ao rejuvenescimento celular, devido ao estímulo à produção de colágeno e elastina. Um exemplo é a máscara Contour, da Omnilux (Figura 23 A).

Outras possuem a capacidade de emitir estímulos em diferentes comprimentos de onda, porém, limitando-se a um por vez. É o caso da Photon Mask, da empresa Project E (Figura 23 B). Ela apresenta sete cores e atrela diferentes benefícios a cada uma delas, de certa forma alinhados aos achados de literatura: violeta (390 nm, melhoria na microcirculação); azul (415 nm, melhoria em peles sensíveis); ciano (490 nm, redução de inflamação); verde (525 nm, suavização de rugas e linhas de expressão); âmbar (590 nm, suavização de manchas); e vermelho (630 nm, aumenta firmeza da pele por meio de secreção de colágeno).

Por fim, os lançamentos mais recentes oferecem o estímulo com dois ou três comprimentos de onda concomitantes. A máscara JoLee (Figura 23 C) emite nas regiões do azul e vermelho e promete diminuição de acne ao mesmo tempo que melhora a textura e aparência geral da pele. O equipamento portátil LumaPro, da empresa Project E (Figura 23 D), permite trabalhar com as cores vermelho, âmbar e azul de forma isolada ou em combinações entre si. Quando em combinação, as empresas descrevem os resultados como simples adição dos efeitos observados de forma isolada.

Figura 23: Diferentes equipamentos disponíveis no mercado para tratamento de sinais de envelhecimento, acne, dentre outros. (A) Máscara Contour, Omnilux; (B) Photon Mask, Project E; (C) Máscara JoLee; e (D) Equipamento LumaPro, Project E.



Fonte: A) AMNILUX (2020), Project E (2020), JOLEE (2020), Project E (2020)

Apesar da oferta de produtos comerciais, não foi encontrada na literatura estudos que tenham utilizado equipamento com a capacidade de emissão nos diferentes comprimentos de onda de forma concomitante para estudos *in vitro*. Foi realizada ampla busca na plataforma PubMed, em busca de artigos cujo desenho experimental compreenda uso de dois ou mais LEDs de forma simultânea. A busca, realizada em Novembro de 2020, utilizando os indexadores: “blue LED” “red LED” “green LED” “yellow LED” em conjunto, ou em combinação aos pares, retornou apenas estudos em vegetais onde foram combinados os LEDs vermelho e azul. Os estudos envolvendo fibroblastos encontrados utilizam delineamento experimental com os LEDs utilizados de forma separada e buscam resultados comparativos, como já abordado na revisão bibliográfica.

A fabricante nacional BioPDI, referência em equipamentos para terapia fotodinâmica *in vitro*, oferece equipamento para irradiação de células em cultura, chamado IrradLed48. O dispositivo é composto por 48 LEDs, possui controle de irradiância e tempo de irradiação, além de diferentes níveis para distanciamento entre objeto de estudo e fonte de luz. A empresa oferece 12 diferentes comprimentos de onda para a construção da fonte de luz, mas o equipamento é monocromático, ou seja,

o usuário deve escolher um comprimento de onda para a montagem do aparato (BioPDI, 2020).

O aparato construído conseguiu entregar a operação em três diferentes comprimentos de onda (455, 525 e 630 nm) de forma isolada ou em diferentes combinações, tanto em pares quanto com os três canais operando ao mesmo tempo. Além das buscas efetuadas no Pubmed, também foi feita busca por patentes no diretório do INPI (Instituto Nacional de Proteção à Inovação) e não foi encontrada anterioridade para a tecnologia desenvolvida. A partir destas informações, foi depositado o pedido de Patente de Invenção para o aparato em Novembro de 2020.

Em seguida, experimentos *in vitro* foram conduzidos para estudar interações da irradiação com diferentes comprimentos de onda aplicados de forma isolada e concomitante.

O Azul de Trypan permite diferenciar células vivas de mortas pela observação da coloração da célula. Devido a integridade da membrana, não há acúmulo do corante no citoplasma das células viáveis, enquanto as células mortas se apresentam com coloração azulada. Dentre as três fluências escolhidas baseadas na revisão de literatura (4 J/cm², 40 J/cm² e 80 J/cm²), os resultados demonstraram diminuição significativa na viabilidade celular para 80 J/cm² independente da combinação de luzes utilizada. De todos os estudos encontrados *in vitro* com LED vermelho ou LED azul, apenas Liebman *et al.* (2010) e Mamalis, Garcha e Jagdeo (2015) utilizaram fluência superior a 80 J/cm². No primeiro, foram descritos impactos em viabilidade celular para comprimentos de onda na região do azul (453 nm), mas não para a região do vermelho (632 nm). O artigo, no entanto, não descreve a densidade de potência utilizada e também aplica um regime de irradiação de forma seriada (três vezes, com intervalo de 24 horas), diferentemente do que foi aplicado no presente estudo. Já Mamalis, Garcha e Jagdeo (2015) focou em 415 nm e encontrou apenas diminuição na proliferação e velocidade de migração dos fibroblastos, sem relatar modificações na viabilidade celular. No artigo observa-se que foi utilizada uma menor densidade de potência, 35 mW/cm² (versus aproximadamente 93 mW/cm² que foi a menor encontrada para o aparato construído para o presente estudo). Possivelmente, além da fluência utilizada, a densidade de potência também seja determinante para que não ocorra diminuição na viabilidade celular. As fluências de 4 J/cm² e 40 J/cm² mostraram-se similares ao controle sem irradiação.

O ensaio de micronúcleo é utilizado há quase quarenta anos como método para determinar a genotoxicidade de diferentes fatores químicos e físicos, incluindo danos ao DNA devido à irradiação (SOMMER; BURACZEWSKA; KRUSZEWSKI, 2020). Devido a fatores como mal segregação ou quebra de cromossomos, o micronúcleo é formado e pode ser visualizado como uma estrutura menor, próxima ao núcleo celular. O presente trabalho utilizou DAPI como marcador para material genético e o ensaio permitiu determinar a genotoxicidade das fluências de 4 J/cm² e 40 J/cm² a partir da contagem do número de micronúcleos formados após irradiação. A irradiação à 80 J/cm² não foi estudada por já ter-se mostrado inviável pelo teste de exclusão por azul de Trypan. Os resultados encontrados demonstraram que a irradiação com fluências de 4 J/cm² e 40 J/cm² não levou à maior genotoxicidade quando comparada ao controle não-irradiado. O resultado é consistente e independe da combinação de luzes utilizada. Esta é uma análise muito difundida para estudos do dano causado por radiação UV e há alguns estudos exploraram seu uso também para radiação visível (KIELBASSA; EPE, 2000; HOFFMANN-DORR *et al.*, 2005). Nestes estudos, foi relatada a formação de micronúcleo e o possível mecanismo através do qual está sendo formado, no entanto, ambos utilizam lâmpada de halogênio, com filtro que permite a passagem de comprimentos de onda acima de 395 nm. Desta forma, o efeito descrito pode ser relacionado aos comprimentos de onda mais próximos à região do ultra-violeta.

O último ensaio relacionado à segurança da irradiação antes de verificar seus possíveis efeitos benéficos, tratou-se do entendimento de seu impacto na formação de espécies reativas de oxigênio. Estas são produtos do metabolismo celular e desempenham papel importante na modulação de diversos mecanismos relacionados à sobrevivência, diferenciação, sinalização e morte celular. No entanto, o desbalanço entre a formação destes radicais e a neutralização do seu excesso leva a danos oxidativos às proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos (DAYEM *et al.*, 2017). A formação de espécies reativas de oxigênio foi visualizada pelo marcador 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCF-DA). Na presença de esterases intracelulares e moléculas oxidativas, como O²⁻, H₂DCF-DA é convertida em DCF (dichlorodihydrofluorescein), uma molécula altamente fluorescente (SUN *et al.*, 2018). Os resultados encontrados demonstraram que a irradiação com fluências de 4 J/cm² e 40 J/cm² não levou à maior formação de espécies reativas de oxigênio quando

comparada ao controle não-irradiado. Foi estudada também a combinação de luzes verde e azul, à 80 J/cm², para melhor correlação entre os resultados encontrados e seu impacto na homeostase, uma vez que esta condição apresentou baixa viabilidade celular no ensaio de exclusão por azul de Trypan. Para esta condição, a formação de EROs foi significativamente superior, demonstrando que os números encontrados para as fluências de 4 J/cm² e 40 J/cm² refletem seu papel para o correto funcionamento celular e não efeitos deletérios.

Em conjunto, os resultados dos ensaios de exclusão por azul de trypan, micronúcleo e formação de EROs demonstraram a segurança para uso das fluências de 4 J/cm² e 40 J/cm² nas diferentes combinações de luz utilizadas. Estudos demonstram a relação dose-dependente dos efeitos benéficos do LED (LIEBMAN *et al.*, 2010; ESMAEELINEJAD; BAYAT, 2013; JUNG *et al.*, 2015, KIM *et al.*, 2016). Desta forma, foi escolhida a maior fluência segura, de 40 J/cm², para melhor entendimento do conteúdo protéico de células submetidas à irradiação. Os resultados da análise por SDS-PAGE indicam achados qualitativos interessantes em proteínas estruturantes, como colágeno, laminina e elastina, além de metaloproteinases de matriz e fatores de crescimento.

Para todos os grupos, é possível observar uma forte banda ao redor de 138 kDa, correspondente à migração para o colágeno tipo I puro, que foi utilizado como padrão para esta proteína especificamente. O colágeno é a principal proteína estruturante da pele e é a mais abundante em mamíferos (BARATI *et al.*, 2020) e está presente em altas quantidades na porção reticular da derme. Em conjunto com elastina, é responsável pela propriedade viscoelástica da pele, que é sua capacidade de retornar ao estado inicial depois de um determinado estresse uma vez que a origem do mesmo seja removida (AZIZ *et al.*, 2016). O deslizamento e realinhamento das fibras de colágeno permite que a pele deforme sem perder sua integridade, enquanto as fibras elásticas retornam a pele a seu estado inicial quando não há mais força externa. Além do estresse mecânico, outros fatores biológicos (como envelhecimento e câncer) e ambientais (como exposição à radiação UV) podem alterar a arquitetura e propriedades estruturais destas redes de colágeno e elastina (OSMAN *et al.*, 2013). Já foram descritos em literatura mais de 20 tipos de colágeno, que se diferenciam por sua estrutura. Todos os tipos são formados por uma tripla hélice, que é composta por duas cadeias idênticas (α 1) e uma químicamente diferente (α 2) (OSMAN *et al.*, 2013).

O colágeno tipo I é majoritariamente encontrado na pele, e o aumento de sua expressão já foi descrito após a irradiação com diferentes comprimentos de onda, como 660 nm (BAROLET *et al.*, 2009), 590 e 630 nm (KERPPERS *et al.*, 2014; KIM *et al.*, 2015; KIM *et al.*, 2016). Apesar de não haver dados quantitativos no presente estudo para avaliação da expressão de colágeno, qualitativamente é possível observar diferenças entre as combinações de luz utilizadas. A irradiação com luz verde sozinha foi a que apresentou banda de intensidade mais fraca quando comparado aos grupos verde+vermelho e verde+vermelho+azul. Isto corrobora os achados descritos na literatura para a estimulação da produção de colágeno encontrada na região do vermelho (630 e 660 nm). No entanto, seria necessária a análise quantitativa para avaliar se há diferenças com relação ao grupo controle. O grupo irradiado com a combinação de luzes verde e azul apresenta-se qualitativamente maior que o grupo irradiado com verde sozinho, indicando possível contribuição da luz azul no estímulo à síntese de colágeno. Um estudo analisou os efeitos do LED azul (450 nm) especificamente na produção de colágeno e demonstrou sua redução em fluência de 30 J/cm² (MIGNON *et al.*, 2018). Seu papel em processos de cicatrização de feridas e recuperação de queimaduras também foi investigado e não foi encontrada evidência de aumento de proliferação de fibroblastos (SOUSA *et al.*, 2010; FERNANDES NETO *et al.*, 2019). Assim sendo, pode-se inferir que, ao contrário de estimular a produção de colágeno, o LED azul neste caso poderia estar atuando de forma a diminuir a influência do LED verde nos mecanismos de degradação do colágeno já presente no meio antes da irradiação.

Lamininas são glicoproteínas compostas por cadeias α , β e γ que se trimerizam formando uma estrutura cruciforme que interage com outros constituintes da membrana basal, sendo essencial para sua formação (RAUR, REINHARDT, 2015). Qualitativamente não é possível observar diferenças nesta proteína dentre os grupos estudados e também não há em literatura maiores esclarecimentos sobre o papel do LED em sua expressão.

Metaloproteinases de matriz é uma família de enzimas proteolíticas. Elas podem tanto ser secretadas quanto estarem ancoradas à membrana plasmática e hidrolisam componentes de matriz extracelular e também moléculas presentes na superfície celular. Elas desempenham papel fundamental na morfogênese, ovulação, implantação do embrião, crescimento neural, angiogênese, cicatrização e apoptose

(NAGASE, MURPHY, 2013). Os resultados encontrados sugerem a presença das seguintes MMPs: 1, 7, 14, 17 e 21. É possível observar, qualitativamente, uma menor quantidade destas nos grupos irradiados com luz vermelha (vermelho+verde e vermelho+verde+azul) quando comparado aos grupos controle e irradiados sem luz vermelha (verde e verde+azul). A MMP1, também conhecida como colagenase, justamente tem por um de seus substratos o colágeno tipo I e sua diminuição por irradiação com luz vermelha já havia sido descrita na literatura (BAROLET *et al.*, 2009; KIM *et al.*, 2015; KIM *et al.*, 2016). O presente estudo corrobora esse achado e adiciona que a concomitância de irradiação de luz vermelha com outros comprimentos de onda aparentemente não interferiu nesta propriedade. Para as MMPs 7, 14, 17 e 21, por sua vez, não existe dado na literatura demonstrando efeitos de irradiação com LED em sua síntese, sendo o achado deste estudo, inédito. Já estão descritos diversos substratos para estas MMPs (LARONHA, CALDEIRA, 2020) e a tabela abaixo sintetiza os principais, relacionados às proteínas encontradas no presente estudo (Tabela 13). As MMP-17 e MMP-21 não apresentam substrato descrito dentre as proteínas candidatas, portanto, muito provavelmente a banda ao redor de 63 kDa deva ser correspondente à MMP-14.

Tabela 13: Correlação entre as metaloproteinases com peso molecular correspondente ao encontrado no SDS-PAGE e seus respectivos substratos já descritos em literatura

MMP	Substratos dentre as proteínas candidatas deste estudo
7	Elastina, Laminina
14	Colágeno I, Laminina
17	Não descrito
21	Não descrito

Fonte: Própria autora.

Os Fatores de Crescimento de Fibroblastos são uma família de fatores de proteínas capazes de atuar em diversas vias de sinalização intracelular. Eles promovem a proliferação de fibroblastos, levando ao reparo e regeneração de uma grande variedade de tecidos, como pele, vasos sanguíneos e músculos (YUN *et al.*, 2010). Qualitativamente é possível observar diferenças entre os grupos irradiados, com a provável menor expressão destes fatores nos grupos verde e verde+azul. Os grupos irradiados com LED vermelho (vermelho+verde e vermelho+verde+azul)

apresentaram resultado similar ao controle. Com relação ao LED verde sozinho, não há na literatura estudos analisando seus efeitos na expressão de FGF e este estudo demonstra sua possível correlação com menor expressão deste fator. Para o LED azul, já foi relatada sua relação com a menor proliferação de fibroblastos (MAMALIS; GARCHA; JAGDEO, 2015), o que pode ser correlacionado à menor expressão de FGF encontrada no grupo verde+azul. Enquanto estudos demonstram maior expressão de FGF quando utilizada irradiação por LED vermelho (ESMAEELINEJAD; BAYAT, 2013; LI *et al.*, 2016), no presente estudo não foram encontradas diferenças em comparação ao controle. Muito provavelmente o LED vermelho estimulou o aumento de FGF, mas este foi compensado pelo efeito diminutivo dos LEDs verde e azul.

8 CONCLUSÕES

Com este trabalho, primeiramente foi construído um aparelho capaz de emitir três diferentes comprimentos de onda de forma isolada ou concomitante, O mesmo apresentou precisão e também foi capaz de trabalhar em fluências similares a equipamentos comerciais que trabalham com os LEDs de forma isolada. Abre-se, a partir daí, a possibilidade de explorar outras combinações, além de outros protocolos experimentais relacionando fluência e densidades de potência distintas.

Três fluências foram inicialmente propostas sendo que a maior, de 80 J/cm^2 afetou a viabilidade celular em todas as combinações de LEDs utilizada e foi excluída do desenho experimental. As fluências de 40 J/cm^2 e 4 J/cm^2 mostraram-se comparáveis ao controle sem irradiação nos ensaios de genotoxicidade e formação de radicais livres.

Os resultados da análise por SDS-PAGE indicam achados qualitativos interessantes em proteínas estruturantes, como colágeno, laminina e elastina, além de metaloproteinases de matriz e fatores de crescimento. Além disto, também demonstrou-se que a interação dos diferentes comprimentos de onda pode levar a interferências modificando resultados encontrados para determinando comprimento de onda quando utilizado de forma isolada. Sugere-se, a fim de confirmar estes achados, estudos com marcadores específicos para estas proteínas de interesse, a fim de comprovar sua identidade e posterior quantificação dos resultados.

9 CONFLITOS DE INTERESSE

A aluna candidata, Maria Emilia de Oliveira Brenha Ribeiro, é atualmente funcionária da Johnson & Johnson Indústria e Comércio de Produtos para a Saúde, sendo que a empresa arcou com parte dos custos deste Doutorado.

REFERÊNCIAS

- ABLON, G. Phototherapy with Light Emitting Diodes: Treating a broad range of medical and aesthetic conditions in dermatology. **J Clin Aesthet Dermatol.**, v. 11, n. 2, p. 21 – 27, 2018.
- ACROYD, R. *et al.* The history of photodetection and photodynamic therapy. **Photochem Photobiol**, v. 74, p. 656 – 669, 2001.
- ALBA, M. N. *et al.* Clinical comparison of salicylic acid peel and LED-laser phototherapy for the treatment of Acne vulgaris in teenagers. **J Cosmet Laser Ther.**, v. 19, p. 49 – 53, 2017.
- ASHKENAZI, H. *et al.* Eradication of Propionibacterium acnes by its endogenous porphyrins after illumination with high intensity blue light. **FEMS Immunol Med Microbiol.**,v. 35, p. 17 – 24, 2003.
- AVCI, P. *et al.* Low-Level laser (light) therapy (LLLT) in skin: stimulating, healing, restoring. **Semin Cutan Med Surg.**, v. 32, n. 1, p. 41 – 52, 2013.
- AZIZ, J. *et al.* Molecular Mechanisms of Stress-Responsive Changes in Collagen and Elastin Networks in Skin. **Skin Pharmacol Physiol.**, v. 29, p. 190 – 203, 2016
- BARATI, M. *et al.* Collagen supplementation for skin health: a mechanistic systematic view. **J Cosmet Dermatol.**, v. 19, p. 2820 – 2829, 2020.
- BAROLET, D. *et al.* Regulation of Skin Collagen Metabolism in vitro using a pulsed 660 nm LED light source: clinical correlation with a single-blinded study. **J Invest Dermatol.**, v.129, p. 2751 – 2759, 2009.
- BioPDI. **Equipamento de Irradiação de Luz IrradLed48**. Disponível em <https://biopdi.com/optica/irradiacao/48-leds/>. Acesso em: 08 nov. 2020.
- BIORAD. **Boletim Técnico 3133**. Disponível em: https://www.biorad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_3133.pdf . Acesso em: 10 nov. 2020.
- BONNANS, M. *et al.* Blue Light: Friend or foe? **J. Photobiol.**, v. 212, 2020.
- CATÃO, M. H. C. V. *et al.* Green LED light has anti-inflammatory effects on burns in rats. **Burns.**, v. 42, p. 392-396, 2016.
- CHO, E. A. *et al.*, Therapeutic Effects of a Light Emitting Diode at a Variety of Wavelengths on Atopic Dermatitis-Like Skin Lesions in NC/Nga Mice. **Ann Dermatol.**, p. 796 – 799, 2016.
- CHUNG, H. *et al.*, The Nuts and bolts of low level laser (light) therapy. **Ann Biomed Eng.**, v. 40, n.2, p. 516 – 533, 2012.
- DANIEL, M. D.; HILLS, J. S. A history of photodynamic therapy. **Aus NZ J Surg.**, V. 61, p. 340 – 348, 1991.

DAYEM, A. A. *et al.* The role of reactive oxygen species (ROS) in the biological activities of metallic nanoparticles. **Int J Mol Sci.**, v. 18, p. 20, 2017.

DENDA, M.; FUZIWARA, S. Visible radiation affects epidermal permeability barrier recovery: selective effects of red and blue light. **J Invest Dermatol.**, v. 128, p. 1335 – 1336, 2008.

DIFFEY, B. L.; FARR, P. M. The challenge of follow-up in narrowband ultraviolet B phototherapy. **Br J Dermatol.** v. 157, p. 344 – 349, 2007.

DIRIDOLOU, S. *et al.* Skin Ageing: changes of physical properties of human skin in vivo. **Int J Cosmet Sci.**, v. 23, p. 353 – 62, 2001

ESMAEELINEJAD, M.; BAYAT, M. Effect of low-level laser therapy on the release of interleukin-6 and basic fibroblast growth factor from cultured human skin fibroblasts in normal and high glucose mediums. **J Cosmet Laser Ther.**, v. 15, p. 310 – 317, 2013.

EUROMONITOR. **Beauty survey 2020: Key insights.** Disponível em: <https://www.euromonitor.com/beauty-survey-2020-key-insights/report>. Acesso em: 10 out. 2020.

FERNANDES NETO, J. A. *et al.* Effect of blue LED on the healing process of third-degree skin burns: clinical and histological evaluation. **Lasers Med Sci.**, v. 34, p. 721 – 729, 2019.

GILABERTE, Y. *et al.* **Nanoscience in Dermatology.** [s.l]: Elsevier, 2016.

HAMBLIN, M.; DEMIDOVA, T, Mechanisms of Low-Level Light Therapy. **Proc. of SPIE**, v.6140, p. 1605 – 1617, 2006.

HARRIS, M. I. **Pele: estrutura, propriedades e envelhecimento.** 3. ed. São Paulo: Senac, 2009.

HAYWOOD, R. Relevance of sunscreen application method, visible light and sunlight intensity to free-radical protection: a study of ex vivo human skin. **Photochem Photobiol.**, v. 82, p. 1123 – 31, 2006.

HOFFMANN-DORR, S. *et al.*, Visible light (>395 nm) causes micronuclei formation in mammalian cells without generation of cyclobutene pyrimidine dimers. **Mut Res.**, v. 572, p. 142 – 149, 2005.

JENKINS, G. Molecular Mechanisms of Skin Ageing. **Mech Ageing Dev.**, v. 123, p. 801 – 810, 2002

JOLEE. **JoLee Therapy Face Acne Mask.** Disponível em: <https://www.ebay.co.uk/itm/JoLee-LED-Light-Therapy-Face-Acne-Mask-for-Spots-Wrinkles-Skin-Rejuvenation-/173823155825>. Acesso em: 08 nov. 2020.

JUNG, Y. R. *et al.*, Regulation of lipid production by light-emitting diodes in human sebocytes. **Arch Dermatol Res.**, v. 307, p. 265 – 273, 2015.

KARU, T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. **J Photochem Photobiol B**, v. 49, p. 1 – 17, 1999.

KEISER, G. Light-Tissue Interactions, *In*: KEISER, G. **Biophotonics, concepts to applications**. Singapore: Springer, 2016

KERPPERS, I. I. *et al.* Effect of light-emitting diode (λ 627 nm and 945 nm λ) treatment on first intention healing: immunohistochemical analysis. **Lasers Med Sci.**, v. 30, n.1, p. 397-401, 2015.

KIELBASSA, C.; ROZA, L.; EPE, B. Wavelength dependence of oxidative DNA damage induced by UV and visible light. **Carcinogenesis.**, v. 18, p. 811 – 816, 1997.

KIELBASSA, C.; EPE, B. DNA damage induced by ultraviolet and visible light and its wavelength dependence. **Methods Enzymol.**, v. 319, p. 436 – 445, 2000

KIM, H. S. *et al.* Continuous irradiation with a 633-nm light-emitting diode exerts an anti-aging effect on human skin cells. **Int J Mol Med.**, v. 35, n. 2, p. 383-90, 2015.

KIM, H. S.; CALDERHEAD, R. G. Is light-emitting diode phototherapy (LED-LLLT) really effective? **Laser Therapy.**, v. 20, p. 205 – 215, 2011.

KIM, S. K. *et al.* Skin photo rejuvenation effects of light-emitting diodes (LEDs): a comparative study of yellow and red LEDs in vitro and in vivo. **Clin Exp Dermatol.**, v. 41, p. 798 – 805, 2016.

KLEIPENNING M. M. *et al.*, Efficacy of blue light vs. red light in the treatment of psoriasis: a double-blind, randomized comparative study. **J Eur Acad Dermatol Venereol.**, v. 26, p. 219 – 225, 2012.

LANZAFAME, R. J. *et al.*, The growth of human scalp hair mediated by visible red-light laser and LED sources in males. **Lasers Surg Med.**, v. 45, n. 8, p. 487 – 95, 2013

LANZAFAME, R. J. *et al.* The growth of human scalp hair in females using visible red-light laser and LED sources. **Lasers Surg Med.**, v. 46, n. 8, p. 601 – 607, 2014

LARONHA, H.; CALDEIRA, J. Structure and function of Human Matrix Metalloproteinases. **Cells.**, v. 9, p. 1076, 2020.

LEE, S. Y.; YOU, C. E.; PARK, M. Y. Blue and Red light combination LED phototherapy for acne vulgaris in patients with skin phototype IV. **Lasers Surg Med.**, v. 39, n. 2, p. 180 – 188, 2007.

LI, Y. *et al.* The Histopathological Investigation of Red and Blue Light Emitting Diode on Treating Skin Wounds in Japanese Big-Ear White Rabbit. **PLoS One.**, v. 11, n. 6, p. 1 – 11, 2016.

LIEBMANN, J. *et al.* Blue-light irradiation regulates proliferation and differentiation in human skin cells. **J Invest Dermatol.**, v. 130, n. 1, p. 259-269, 2010.

MAGALHÃES, L. Camadas da pele. **Toda Matéria**. Disponível em: <https://www.todamateria.com.br/camadas-da-pele/>. Acesso em: 10 jul. 2020.

MAHMOUD, B. H. *et al.* Effects of visible light on the skin. **Photochem, Photobiol.**, v. 84, n. 2, p. 450-462, 2008.

MAMALIS, A.; GARCHA, M.; JAGDEO, J. Light emitting diode-generated blue light modulates fibrosis characteristics: fibroblast proliferation, migration speed, and reactive oxygen species generation. **Lasers Surg Med.**, v. 47, n. 2, p. 210-215, 2015.

MAMALIS, A.; SIEGEL, D.; JAGDEO, J. Visible Red Light Emitting Diode Photo biomodulation for Skin Fibrosis: Key Molecular Pathways. **Curr Dermatol Rep.**, v. 5, p.121-128, 2016.

MIGNON, C. *et al.* Differential response of human dermal fibroblast subpopulations to visible and near-infrared light: potential of photobiomodulation for addressing cutaneous conditions. **Lasers Surg. Med.**, v. 50, p. 859 – 882, 2018.

MOREIRA, S. H. *et al.* Evaluation of angiogenesis, inflammation and healing on irradiated skin graft with low-level laser therapy in rats. **Lasers Med Sci.**, v. 35, p. 1103-1109, 2020.

MORTON, C. A. *et al.* An open study to determine the efficacy of blue light in the treatment of mild to moderate acne. **J Dermatol Treat.**, v. 16, p. 219 – 223, 2005.

NAGASE, H.; MURPHY, G. **Encyclopedia of Biological Chemistry**. 2. ed. [s.l.]: Academic Press, 2013.

OMNILUX. **Omnilux Contour™ FACE**. Disponível em: <https://omniluxled.com/contour/>. Acesso em 18 out. 2020.

OMNILUX. **LumaPro**. Disponível em: <https://www.projectebeauty.com/collections/project-e-beauty-brand/products/copy-of-project-e-beauty-brand-table-top-7-color-led-photon-red-blue-yellow-beauty-face-collagen-facial-light>. Acesso em 08 de novembro de 2020.

OPEL, D. R. *et al.*, Light-emitting diodes: a brief review and clinical experience. **J Clin Aes Dermatol.**, v. 8, n. 6, 2015.

OSMAN, O. S. *et al.* A novel method to assess collagen architecture in skin. **BMC Bioinformatics.**, v. 14, p. 260, 2013.

PROJECT E. **Project E Beauty Photon LED Mask**. Disponível em: <https://www.projectebeauty.com/collections/project-e-beauty-brand/products/led-photon-therapy-red-blue-green-light-treatment-facial-beauty-skin-care-mask>. Acesso em: 10 nov. 2020.

RAUR, J.; REINHARDT, D. P. **Stem Cell Biology and Tissue Engineering in Dental Sciences**. [s.l.:s.n.], 2015.

SAMPLE, A.; HE, Y. Y. Mechanisms and prevention of UV-induced melanoma. **Photodermatol Photoimmunol Photomed.**, v. 34, n. 1, p. 13 – 24, 2018.

SIMOES, T. M. S. *et al.* Photobiomodulation of red and green lights in the repair process of third-degree skin burns. **Lasers Med Sci.**, v. 35, n. 1, p. 51 – 61, 2020.

SOMMER, S.; BURACZEWSKA, I.; KRUSZEWSKI, M. Micronucleous assay: The State of Art and Future Directions. **Int J Mol Sci.**, v. 21, p. 1534, 2020

SORBELLINI, E.; RUCCO, M.; RINALDI, F. Photodynamic and photobiological effects of light-emitting diode (LED) therapy in dermatological disease: an update. **Lasers Med Sci.**, v. 33, p. 1431 – 1439, 2018.

SOUSA, A. P. *et al.* Effect of LED phototherapy of three distinct wavelengths on fibroblasts on wound healing: a histological study in a rodent model. **Photomed laser surg.**, v. 28, p. 547 – 522, 2010.

SUN, Q. *et al.* Red light-emitting diode irradiation regulates oxidative stress and inflammation through SPHK1/NF- κ B activation in human keratinocytes. **J Photochem Photobiol B.**, v. 186, p. 31 – 40, 2018.

TIKENKO-HOLAND, N.; MOORE, L. E.; SMITH, M. T. Measurement and characterization of micronuclei in exfoliated human cells by fluorescence in situ hybridization with a centromeric probe. **Mutat Res.**, v. 312, p. 39 – 50, 1994.

TREMBLAY, J. F. *et al.* Light-emitting diode 415 nm in the treatment of inflammatory acne: an open-label, multicentric, pilot investigation. **J Cosmet Laser Ther.**, v. 13, p. 308 – 314, 2006.

WEISS, R. A. *et al.* Clinical experience with Light-Emitting diode (LED) photo modulation. **Dermatol Surg.**, v. 31, p. 1199 – 1205, 2005.

WHEELAND, R. G.; DHARWAN, S. Evaluation of self-treatment of mild to moderate facial acne with blue light treatment system. **J Dugs Dermatol.**, v. 10, p. 596 – 602, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **What's Ionizing Radiation?** Disponível em: https://www.who.int/ionizing_radiation/about/what_is_ir/en/ . Acesso em: 18 out. 2020.

YUN, Y. R. *et al.* Fibroblast Growth Factors: Biology, Function and Application for Tissue Regeneration. **J Tissue Eng.**, v. 2010, 2010.

ANEXO 1 – CERTIFICADO DE REGISTRO DE SOFTWARE NO INPI



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA ECONOMIA
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
DIRETORIA DE PATENTES, PROGRAMAS DE COMPUTADOR E TOPOGRAFIAS DE CIRCUITOS INTEGRADOS

Certificado de Registro de Programa de Computador

Processo Nº: **BR512019001891-5**

O Instituto Nacional da Propriedade Industrial expede o presente certificado de registro de programa de computador, válido por 50 anos a partir de 1º de janeiro subsequente à data de 27/08/2019, em conformidade com o 52º, art. 2º da Lei 9.609, de 19 de Fevereiro de 1998.

Título: Software para operar um equipamento de emissão de luz

Data de publicação: 27/08/2019

Data de criação: 15/05/2019

Titular(es): FUNDACAO VALEPARAIBANA DE ENSINO

Autor(es): MARIA EMILIA DE OLIVEIRA BRENHA RIBEIRO; JULIANA GUERRA PINTO; JULIANA FERREIRA STRIXINO; ALESSANDRO CORREA MENDES

Linguagem: C

Campo de aplicação: SD-09

Tipo de programa: IT-03

Algoritmo hash: SHA-512

Resumo digital hash:

32bca59593b79d172e7dca45c26a65e01be6905d8c4ea211c97eb2fc82382d484a0221edb444d073d4b210eb8a66f7991d1ffa51b16b53d1d2ca2ad63de88954

Expedido em: 03/09/2019

Aprovado por:

Helmar Alvares

Chefe da DIPTO - Portaria/INPI/DIRPA Nº 09, de 01 de julho de 2019

ANEXO 2 - PEDIDO DE PATENTE DE INVENÇÃO – APARATO DE IRRADIAÇÃO LUMINOSA



19/11/2020 870200146530
19:08
29409161926412310

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2020 023694 6

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: FUNDACAO VALEPARAIBANA DE ENSINO

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 60191244000120

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: PCA CANDIDO DIAS CASTEJON, 116 - CENTRO

Cidade: São José dos Campos

Estado: SP

CEP: 12245-720

País: Brasil

Telefone: (12)39471090

Fax:

Email: fve@univap.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 19/11/2020 às 19:08, Petição 870200146530

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): APARATO DE IRRADIAÇÃO LUMINOSA

Resumo: A presente invenção refere-se a um aparato de irradiação luminosa (1) compreendendo: câmara de teste (6), sistema elétrico e eletrônico, fitas de LED (7) e suporte às placas; em que a câmara de teste (6) possui uma pluralidade de nichos (8) nas paredes laterais para encaixe do suporte às placas; em que o sistema elétrico e eletrônico compreende uma plataforma Arduino UNO, painel de interface com o usuário (2) e três botões operacionais (3); em que a fita de LED (7) possui três canais independentes de condução do sinal elétrico (RGB); e em que o sistema eletrônico realiza o controle independente da emissão de luz em diferentes comprimentos de onda através dos diferentes canais.

Figura a publicar: 0

Dados do Procurador

Procurador:

Nome ou Razão Social: Denis Allan Daniel

Numero OAB:

Numero API: 558

CPF/CNPJ: 00621218715

Endereço: Av. Republica do Chile, nº 230 - 3º andar- Centro

Cidade: Rio de Janeiro

Estado: RJ

CEP: 20031-170

Telefone: (21) 2102-4200

Fax: (21) 2524-3344

Email: expediente@daniel-ip.com

Escritório:

Nome ou Razão Social: Daniel Advogados (Alt.de Daniel & Cia)

CPF/CNPJ: 33073800000191

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 4**Nome:** MARIA EMILIA DE OLIVEIRA BRENHA RIBEIRO**CPF:** 33741588890**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Física:** Doutorando**Endereço:** Rua Fernando Fagundes, 71**Cidade:** São José dos Campos**Estado:** SP**CEP:** 12244-512**País:** BRASIL**Telefone:****Fax:****Email:****Inventor 2 de 4****Nome:** JULIANA FERREIRA STRIXINO**CPF:** 25357798893**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Física:** Professor do ensino superior**Endereço:** Rua Ruivo, 143, ap 301**Cidade:** São José dos Campos**Estado:** SP**CEP:** 12246-130**País:** BRASIL**Telefone:****Fax:****Email:****Inventor 3 de 4**

Nome: JULIANA GUERRA PINTO

CPF: 35237780857

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Av. Shishima Hifume, 3490, ap 24B

Cidade: São José dos Campos

Estado: SP

CEP: 12244-390

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Inventor 4 de 4

Nome: ALESSANDRO CORRÊA MENDES

CPF: 02522862944

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Inês Maria Cuoghi, 50

Cidade: São José dos Campos

Estado: SP

CEP: 12244-857

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Comprovante de pagamento de GRU 200	200981-0 Guia.pdf
Relatório Descritivo	200981-0 Relatório.pdf
Reivindicação	200981-0 Reivindicação.pdf
Desenho	200981-0 Desenhos.pdf
Resumo	200981-0 Resumo.pdf

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 19/11/2020 às 19:08, Petição 870200146530